

**DIE PROGNOTISCHE BEDEUTUNG DES NACHWEISES
VON ENTEROVIRUS-RNA IM MYOKARD BEI
IDIOPATHISCHER DILATATIVER KARDIOMYOPATHIE**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Christiane Tresselt**
geboren am **08. 06. 1975 in Jena**

Gutachter:

1 Prof. Dr. med. Hans Reiner Figulla, Jena

2 Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Andreas Henke, Jena

3 Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Lotze, Friedrichroda

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. 03. 2006

Gewidmet meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen

Zusammenfassung

1.	Einleitung	3
1.1.	Die Kardiomyopathien	3
1.2.	Die idiopathische dilatative Kardiomyopathie	4
1.2.1.	Epidemiologie und Ätiologie	4
1.2.2.	Klinische Befunde	7
1.2.3.	Diagnostik und Therapie	7
2.	Ziele der Arbeit	10
3.	Methoden	11
3.1.	Patienten	11
3.2.	Anamnese	12
3.3.	Transthorakale Echokardiographie	13
3.4.	Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchung und Endomyokardbiopsie	13
3.5.	Enterovirusnachweis	14
3.6.	Histologie, Histomorphometrie und Immunhistologie	15
3.6.1.	Histologie	15
3.6.2.	Histomorphometrie	15
3.6.3.	Immunhistologie	16
3.7.	Herzfrequenzvariabilität	18
3.8.	Einschwemmkatheteruntersuchung	20
3.9.	Follow-up	20
3.10.	Statistik	22
4.	Ergebnisse	23
4.1.	Enterovirusnachweis	23
4.2.	Klinische Daten	23
4.3.	Histologie und Histomorphometrie	26
4.4.	Immunhistologie	26

4.5.	Nicht-invasive Diagnostik	28
4.5.1.	Echokardiographische Parameter	28
4.5.2.	Parameter der Herzfrequenzvariabilität im Zeitbereich	28
4.6.	Invasive Diagnostik	29
4.6.1.	Hämodynamische Parameter in Ruhe	29
4.6.2.	Hämodynamische Parameter unter Belastung	30
4.7.	Follow-up	31
4.7.1.	Patienten	31
4.7.2.	Mortalität	32
4.7.3.	NYHA-Klassifikation	33
4.7.4.	Follow-up der nicht-invasiven Diagnostik	35
4.7.4.1.	Echokardiographische Parameter	35
4.7.4.2.	Herzfrequenzvariabilität	39
4.7.5.	Invasiv gemessene Hämodynamik in Ruhe und unter Belastung	40
4.7.6.	Medikamentöse Therapie	42
5.	Diskussion	43
5.1.	Enterovirusnachweis	43
5.2.	Klinische Basisdaten	45
5.3.	Klinischer Verlauf	46
5.3.1.	Mortalität	46
5.3.2.	Die NYHA-Klassifikation	49
5.4.	Histomorphometrie und Immunhistologie	51
5.5.	Nicht-invasive Diagnostik	53
5.5.1.	Hämodynamische Parameter in der transthorakalen Echokardiographie	53
5.5.2.	Herzfrequenzvariabilität im Langzeitelektrokardiogramm	55
5.6.	Invasiv gemessene hämodynamische Parameter	56
5.7.	Therapie der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie	57
6.	Schlussfolgerungen	60
7.	Literaturverzeichnis	61
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

Verzeichnis der Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AICD	Automatic Implantable Cardioverter Defibrillator
bpm	beats per minute (Herzschläge pro Minute)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EDV	Enddiastolisches Volumen
EV	Enterovirus
GF	Gesichtsfeld
HF	Herzfrequenz
HI	Herzindex
HMV	Herzminutenvolumen
HRV	Heart Rate Variability (Herzfrequenzvariabilität)
HRV-TI	Triangel – Index
KHK	Koronare Herzkrankheit
KÖF	Körperoberfläche
LSB	Linksschenkelblock
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MHC	Major Histocompatibility Komplex
NYHA	New York Heart Association
PAP	pulmonal-arterieller Druck
PCWP	pulmonal-kapillärer Verschlussdruck (pulmonal capillary wedge pressure)
RR	Abstand zweier Herzschläge (R-Zacke im EKG)
RRI	Mittleres RR- Intervall
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase – Kettenreaktion
RVEDP	rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
SDNN	Standardabweichung aller NN-Intervalle über 24-Stunden
SVI	Schlagvolumenindex
WHO	World Health Organization

Zusammenfassung

Seit der Einführung neuer molekularbiologischer Methoden gelten die Enteroviren, insbesondere die Coxsackie-B-Viren, neben den Adeno- und Parvoviren, als die häufigsten Viren, die mit einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) assoziiert sind und durch eine Myokardbiopsie nachgewiesen werden können. Über die prognostische Bedeutung des Nachweises von myokardialer Enterovirus-RNA bei der idiopathischen DCM lagen zu Studienbeginn nur zwei Langzeituntersuchungen mit konträren Ergebnissen hinsichtlich der Mortalität der Patienten vor. Ziel dieser Studie war es daher bei Patienten mit idiopathischer DCM die prognostische Bedeutung des Nachweises von Enterovirus-RNA im Myokard hinsichtlich des klinischen und hämodynamischen Verlaufes dieser chronischen Herzmuskelerkrankung zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurden 64 Patienten (55 Männer, Alter 51 ± 11 Jahre) untersucht, bei denen nach klinischer und invasiver Diagnostik mittels Myokardbiopsie die Diagnose einer DCM gestellt werden konnte. Neben der histologischen und immunhistologischen Beurteilung der Myokardbiopsien erfolgten molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis enteroviraler RNA mit Hilfe der RT-PCR und anschließender Southern-Blot-Hybridisierung. Bei allen Patienten wurde routinemäßig ein Echokardiogramm durchgeführt. Bei einem Teil der Patienten erfolgten zusätzlich die Analyse der Herzfrequenzvariabilität und eine Einschwemmkatheteruntersuchung. Über einen mittleren Zeitraum von $23,0 \pm 9,1$ Monaten (Spannbreite 12-64 Monate) wurde der klinische und hämodynamische Verlauf erfasst und das NYHA-Stadium, die echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sowie der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) in sechs bis 12-monatigen Abständen dokumentiert.

Bei 26/64 (41%) Patienten konnte Enterovirus-RNA im Myokard nachgewiesen werden, 38/64 (59%) Patienten waren Enterovirus-negativ. Die beiden Patientengruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich klinischer Basisdaten, NYHA-Stadium, Herzinsuffizienztherapie sowie echokardiographisch und invasiv

bestimmter hämodynamischer Parameter. Weiterhin fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der immunhistologischen Befunde.

In der Enterovirus-positiven Gruppe verstarben 2/26 (8%), in der Enterovirus-negativen Gruppe 6/38 (16%) Patienten auf Grund einer kardialen Ursache, was allerdings in der Kaplan-Meier Analyse keinen signifikanten Unterschied ergab. Die Enterovirus-positiven Patienten zeigten gegenüber den Enterovirus-negativen Patienten eine hochsignifikante Verbesserung der NYHA-Klassifikation ($p < 0.0001$). Auch bei den Enterovirus-negativen Patienten war eine zwar weniger ausgeprägte, jedoch signifikante Verbesserung der NYHA-Klassifikation und der LVEF feststellbar. Der LVEDD nahm in beiden Gruppen deutlich ab, wobei sich der mittlere Unterschied nicht signifikant zwischen beiden Gruppen unterschied.

Bei der Einschwemmkatheteruntersuchung waren keine Veränderungen bezüglich des pulmonal-kapillären Verschlussdruckes und des pulmonal-arteriellen Mitteldruckes zwischen den Patientengruppen feststellbar.

Dagegen wurde bei der Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HRV) eine Zunahme des mittleren RR-Intervalls und somit eine Abnahme der Herzfrequenz bei beiden Gruppen beobachtet. Bei den Enterovirus-positiven Patienten kam es zusätzlich zu einer Verbesserung des sogenannten Triangel-Index, der ein artefaktbereinigtes Maß für die HRV darstellt.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich bei der Enterovirus-assoziierten DCM um eine Untergruppe der DCM mit günstiger Prognose handelt. Somit scheint der Nachweis von enteroviraler RNA im Myokard von prädiktivem Wert für den Krankheitsverlauf der idiopathischen DCM zu sein.

Ob die deutliche Verbesserung der subjektiven Belastbarkeit und der echokardiographisch bestimmten hämodynamischen Parameter der Enterovirus-positiven Patienten mit DCM auf eine Viruselimination während der Nachbeobachtungszeit zurückzuführen ist oder ob ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf der Patienten mit idiopathischer DCM und der unterschiedlich ausgeprägten Replikationsaktivität myokardialer Enteroviren besteht, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht beantworten und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

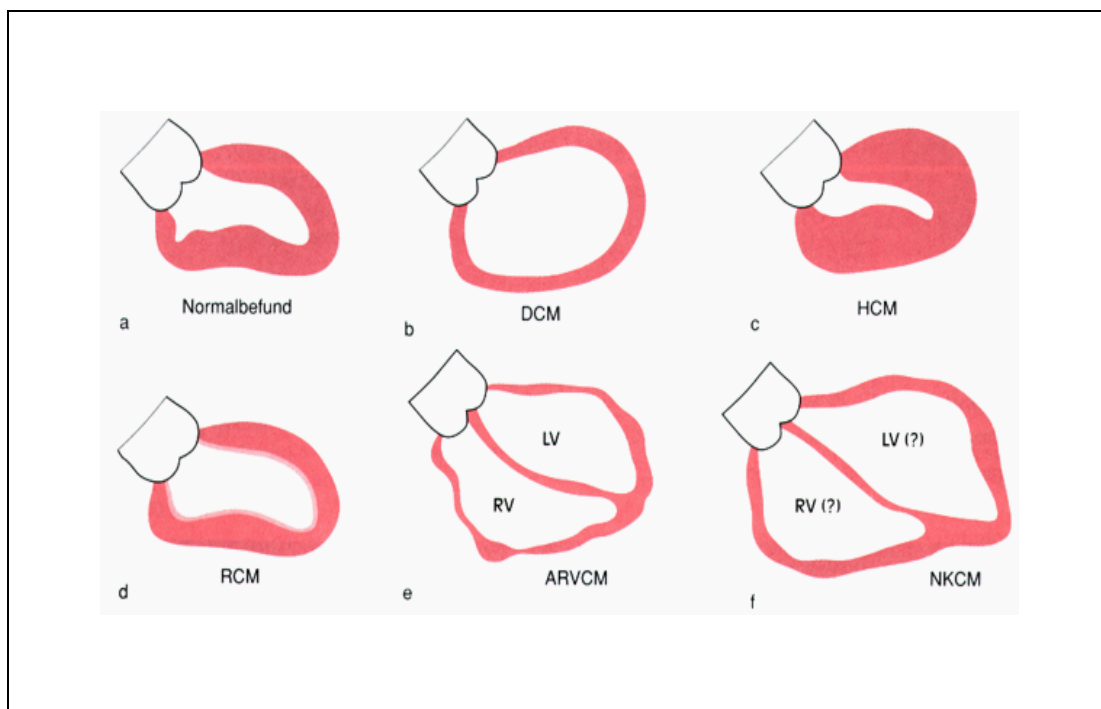
1. Einleitung

1.1. Die Kardiomyopathien

Nach der neuen WHO/ISFC – Klassifikation von 1995 werden alle Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer objektivierbaren kardialen Funktionsstörung einhergehen, als Kardiomyopathien bezeichnet. Die Unterscheidung erfolgt anhand des klinischen Phänotyps, d.h. nach der Hämodynamik und der makroskopischen Anatomie (Richardson et al., 1996). Wie aus der Abbildung 1 zu entnehmen ist, werden fünf Formen der Kardiomyopathie unterschieden:

1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)
2. Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)
3. Restriktive Kardiomyopathie (RCM)
4. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM)
5. Nichtklassifizierbare Kardiomyopathie (NKCM)

Abbildung 1:



Klassifikation der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC 1995 (Maisch, 1998)

(DCM = Dilatative Kardiomyopathie; HCM = Hypertrophische Kardiomyopathie, RCM = Restriktive Kardiomyopathie; ARVCM = Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie; NKCM = Nichtklassifizierbare Kardiomyopathie)

Somit ist der Begriff Kardiomyopathie nicht mehr nur auf die ätiologisch nicht erklärbaren, also idiopathischen Herzmuskelerkrankungen beschränkt, sondern umfasst, im Gegensatz zu der von 1980 aufgestellten WHO/ISFC-Klassifikation (Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies, 1980), alle kardialen Funktionsstörungen (Maisch, 1998).

Die Klassifikation wird für alle hämodynamischen Phänotypen durch eine ätiopathogenetische Einteilung ergänzt, die die idiopathischen Kardiomyopathien von den spezifischen „sekundären Formen“ trennt. Darunter versteht man Herzmuskelerkrankungen, deren Ätiologie und Pathogenese bekannt sind. Sie zeigen sich meist klinisch unter dem Bild einer DCM und sind mit kardialen, toxischen, systemischen oder metabolischen Grunderkrankung assoziiert. Die wichtigsten spezifischen Kardiomyopathien sind die inflammatorische (akute oder chronische Myokarditis mit kardialer Dysfunktion), die hypertensive, die ischämische und die rein valvuläre Kardiomyopathie.

1.2. Die idiopathische dilatative Kardiomyopathie

1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die idiopathische DCM wird gemäß der WHO durch die Dilatation des linken oder beider Ventrikel und einer herabgesetzten Pumpleistung, einer überwiegend systolischen Kontraktionsstörung mit zusätzlich diastolischer Komponente charakterisiert. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 30. und 45. Lebensjahr, wobei überwiegend das männliche Geschlecht betroffen ist (Maisch, 1998). Die Inzidenz liegt bei 6 - 7,9 pro 100 000 Einwohner pro Jahr und stellt somit die häufigste Form der primären Kardiomyopathien dar (Codd et al., 1989).

Die idiopathische DCM ist eine Herzmuskelerkrankung unklarer Ätiologie und Pathogenese mit einem polymorphen Erscheinungsbild. Da es keine spezifischen Symptome oder Befunde für diese Erkrankung gibt, erfolgt die Diagnosestellung per exlusionem. Eine Heilung ist bisher nicht möglich. Daher

sind die Differentialdiagnose und die Erforschung der Entstehungsursache für die Prävention und Therapie von entscheidender Bedeutung.

Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass familiär vererbte Formen der idiopathischen DCM in etwa 20-30% der Fälle auftreten (Mestroni et al., 1998). Verschiedene Genloci wurden schon identifiziert. Meist liegt ein autosomal-dominanter Erbgang vor. In seltenen Fällen findet man einen X-chromosomal-rezessiven Erbgang. Beispielsweise führen Mutationen des Kernhüllproteins Lamin-A/C-Gens zur dilatativen Kardiomyopathie, assoziiert mit Störungen des Reizleitungssystems (Taylor et al., 2003; Sigusch et al., 2004). Die familiäre DCM kann nicht anhand klinischer oder morphologischer Merkmale festgestellt werden, sondern erfordert ein Familienscreening für die Identifikation (Schönberger et al., 2004; Mestroni et al., 1998; Mestroni et al., 1997).

Durch die Entwicklung hochsensitiver molekularbiologischer Methoden, wie der In-situ-Hybridisierung und der reversen Transkriptase – Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) vor einigen Jahren wurde es möglich, virale Genome (z. B. Enteroviren) im Myokard auch bei einer latenten Infektion mit restringierter Replikation nachzuweisen (Grasso et al., 1992; Koide et al., 1992; Kandolf et al., 1991; Weiss et al., 1991; Jin et al., 1990; Tracy et al., 1990; Kandolf et al., 1987; Bowles et al., 1986). Neben der hohen Sensitivität ermöglicht die In-situ-Hybridisierung auch eine genaue Lokalisation der Virus-RNA (z.B. Enteroviren) bzw. DNA (z.B. CMV-Virus) auf zellulärer Ebene, wodurch die Infektion einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden kann (Maisch et al., 2000).

Bei den infektiösen Herzmuskelerkrankungen wurden die Enteroviren, besonders das Coxsackie-Virus B3 und B4, neben den Adenoviren, den Parvoviren B19, den Zytomegalieviren sowie den Herpesviren, als die am häufigsten mit einer idiopathischen DCM assoziierten Viren beschrieben (Lotze et al., 2004; Bowles et al., 2003; Fujioka et al., 2000; Pauschinger et al., 1999; Figulla et al., 1995; Why et al., 1994; Kandolf et al., 1987, Bowles et al., 1986).

Bei verschiedenen Untersuchungen im chronischen Stadium der Myokarditis konnten persistierende Infektionen mit Enteroviren in den Myokardzellen

nachgewiesen werden, nachdem die akute Entzündungsreaktion schon größtenteils abgeklungen war (Archard et al., 1991). Daher wird angenommen, dass die virale Infektion sowie die virale Persistenz ein wichtiger prädisponierender Faktor für die Entstehung einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung und der Dilatation der Ventrikel ist, was letztlich zu einer schweren Herzinsuffizienz mit akutem Herzversagen beim Menschen führen kann (Figulla, 2004; Pauschinger et al., 2004; Arbustini et al., 2001; Bowles et al., 1986). Inwieweit diese Viruspersistenz oder ein durch den Virusinfekt getriggelter autoimmunologischer Prozess von Bedeutung für die Entstehung der idiopathischen DCM sind, bleibt bisher unklar (Bendler, 1991).

Die Hypothese der viralen Persistenz wird durch klinische Untersuchungen mittels molekularbiologischer Methoden an Patienten mit Myokarditis und anhand verschiedener Tier- und in vitro-Modelle unterstützt (Henke, 2002; Wessely et al., 1998; Herzum et al., 1995; Kyu et al., 1992; Morita, 1981). Die Prävalenz der kardiotropen Viren in Endomyokardbiopsien scheint jedoch außerordentlich variabel zu sein, wobei die Angaben für den Nachweis von enteroviraler RNA je nach Nachweismethode von 10-67% auffällig schwanken (Grumbach et al., 1999; Pauschinger et al., 1999; Figulla et al., 1995; Krämerer et al., 1994; Why et al., 1994; Petitjean et al., 1992; Weiss et al., 1992; Archard et al., 1991; Jin et al., 1990).

Das häufige Vorkommen viraler Genome im Myokard bei Patienten mit idiopathischer DCM liefert einen klaren Hinweis, dass die virale Myokarditis als hauptsächliche Ursache bei der Entstehung der DCM in Frage kommt, aber ein Beweis dieses Zusammenhangs ist nach wie vor ausstehend (Mason, 2003; Mason, 2002; Kuhl et al., 1995; Kawai, 1999; Wessely et al., 1998).

Da Enteroviren aus einem Genom mit singulärer RNA mit positiver Polarität bestehen, welches während der aktiven viralen Replikation in eine Minus-Strang RNA umgeschrieben wird (Hohenadl et al., 1991), konnte in neueren Studien mit Hilfe einer plus/minus – strangspezifischen Analyse auch eine virale replikative Aktivität im Myokard nachgewiesen werden (Fujioka et al., 2004; Deguchi et al., 2001; Fujioka et al., 2000; Pauschinger et al., 1999). Hiermit wurden neue

Perspektiven in der Erforschung der viralen Ätiologie und Pathogenese der DCM aufgezeigt.

1.2.2. Klinische Befunde

Klinisch, pathologisch – anatomisch und hämodynamisch unterscheidet sich die idiopathische DCM nicht von anderen Formen der Herzinsuffizienz. Die Ursachen der gestörten Hämodynamik können so variabel sein wie das Krankheitsbild selbst.

Durch den langsamen Verlauf wird die DCM oft erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt. Die Kardinalsymptome sind klinisch durch das Auftreten belastungsabhängiger Dyspnoe, körperlicher Schwäche, von Rhythmusstörungen und Palpitationen gekennzeichnet. Bei dem voll entwickelten Krankheitsbild können alle Schweregrade der Herzinsuffizienz angetroffen werden. Eine spontane Verbesserung oder Stabilisierung des Erkrankungszustandes ist bei etwa einem Drittel der Patienten zu beobachten (Figulla et al., 1995; Figulla et al., 1985). Mit einer 5-Jahres-Mortalitätsrate zwischen 15-75% und einer jährlichen Mortalität von 10% ist die DCM generell als prognostisch ungünstige Erkrankung einzustufen (Di Lenarda et al., 2004; Kühl et al., 1997). Zu den häufigsten Todesursachen zählen die progrediente Herzinsuffizienz und der plötzliche Herztod infolge ventrikulärer Herzrhythmusstörungen (Maisch et al., 1998).

1.2.3. Diagnostik und Therapie

Zur primären Diagnosestellung der idiopathischen DCM sind die Echokardiographie, die Herzkatheteruntersuchung mit Koronarangiographie und eine Endomyokardbiopsie, sowie eine histologisch und immunhistologische Untersuchung der Myokardbiopsiepartikel, zum Ausschluss einer Myokarditis, obligat (Maisch et al., 2002; Pauschinger et al., 1999; Figulla et al., 1995; Figulla et al., 1985).

Allgemein gelten die europäischen Therapierichtlinien der Herzinsuffizienz (Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology, 2001) auch für die idiopathische DCM. Da bei der idiopathischen DCM die auslösenden Faktoren nicht bekannt sind, stehen primär symptomatische Maßnahmen zur Verfügung. Diese umfassen diätetische Maßnahmen mit Kochsalz- und Wasserretention, Alkohol- und Nikotinkarenz. Durch die kombinierte klassische Gabe von Diuretika, Aldosteronantagonisten (z.B. Spironolacton), Angiotensin–Converting-Enzym-Inhibitoren und/oder AT1-Rezeptorantagonisten sowie Beta-Rezeptorenblockern konnte neben der Erleichterung der subjektiven Symptomatik auch eine verbesserte Prognose hinsichtlich des Überlebens erreicht werden (Bauriedel et al., 2005; Di Lenarda et al., 2004; Young et al., 2004; Hoppe et al., 2001; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology, 2001). Die Glykosidgabe (Digoxin oder Digitoxin) führt zu einer symptomatischen Verbesserung und reduziert die Anzahl der stationären Aufnahmen wegen Herzinsuffizienz, ohne jedoch die Prognose zu verbessern. Unbestritten ist dagegen die Rolle der Glykoside beim tachykard übergeleiteten Vorhofflimmern und vorliegender Herzinsuffizienz (Hornestam, 2003; Reiffel, 2000).

Bei einem Drittel der Fälle kommt es zum Auftreten von Kammetachykardien, die zum plötzlichen Herztod führen können. Bei diesen Patienten kann eine Therapie mit Amiodaron oder ein implantierbarer Defibrillator die Prognose günstig beeinflussen, wobei eine neue Studie einen klaren Vorteil für die Defibrillatortherapie bei der DCM mit einer linksventikulären Ejektionsfraktion (LVEF) < 35% gezeigt hat [SCD-HeFT Studie (Grimm et al., 2004)].

Soweit keine Kontraindikationen vorliegen, sollte bei einer erniedrigten Ejektionsfraktion <35% oder bei Vorhofflimmern eine orale Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten, z. B. Phenprocoumon oder Warfarin erfolgen, um systemischen Embolien vorzubeugen. Die konservativ nicht beherrschbare DCM stellt die häufigste Indikation (>50%) für eine Herztransplantation als ultima ratio dar.

Ein neuer, momentan intensiv untersuchter Therapieansatz ist die immunsuppressive und antivirale Therapie (Noutsias et al., 2003; Kühl et al., 2003; Wojnicz et al., 2001). Die Ergebnisse großer randomisierter Studien [ESETCID (European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Disease; Hufnagel et al., 2000); BICC (Betaferon® In Chronic Viral Cardiomyopathy; Kuhl et al., 2003)] sind allerdings erst in den nächsten Jahren zu erwarten.

2. Ziele der Arbeit

Über die prognostische Bedeutung des Nachweises von myokardialer Enterovirus-RNA bei der idiopathischen DCM lagen zu Studienbeginn im November 1998 nur zwei prospektive Studien mit gegensätzlichen Ergebnissen hinsichtlich des Krankheitsverlaufes und der Mortalität vor (Figulla et al., 1995; Why et al., 1994). In der Studie von Why et al. (1994) kam man zu dem Ergebnis, dass der Nachweis von Enterovirus-Genomen im Myokard bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert ist und somit eine schlechte Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf darstellt. Im Gegensatz dazu konnten Figulla et al. (1995) zeigen, dass der Nachweis von enteroviraler RNA als prognostisch günstiges Zeichen hinsichtlich der Hämodynamik und der Überlebenswahrscheinlichkeit bei der idiopathischen DCM zu werten sei.

Daher war es Ziel der vorliegenden prospektiven Studie, folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Wie hoch ist die Prävalenz von enteroviraler RNA im Myokard bei Patienten mit idiopathischer DCM?
2. Zeigen sich unterschiedliche Überlebensraten bei Enterovirus-positiver und Enterovirus-negativer DCM?
3. Gibt es Unterschiede bezüglich des klinischen und hämodynamischen Verlaufes zwischen den beiden Gruppen über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten? Kann man daraus eine individuelle unterschiedliche Prognose für die Patienten mit DCM ableiten?

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

In diese prospektive Studie wurden 64 konsekutive Patienten eingeschlossen (55 Männer [86%]; 9 Frauen [14%]); mittleres Alter 51 ± 11 Jahre), die im Zeitraum von Mai 1996 bis Juni 1999 wegen einer chronischen Herzinsuffizienz stationär in der Klinik für Innere Medizin I der Friedrich Schiller-Universität in Jena aufgenommen worden waren. Alle zeigten eine echokardiographisch eingeschränkte systolische Pumpfunktion mit Kardiomegalie, sowie eine angiographisch nach der area-length-method (Dodge et al., 1993) ermittelte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) von weniger als 55% in Ruhe.

Nach angiographischem Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung und einer Myokarditis mittels Myokardbiopsie anhand der Dallas-Kriterien (Aretz et al., 1987) wurde die klinische Diagnose einer idiopathischen DCM, entsprechend der neuen Definition der World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology (WHO/ISFC) von 1995 gestellt.

Patienten mit einer arteriellen Hypertonie, einem hämodynamisch relevanten Herzklappenvitium (ausgenommen einer milden relativen Mitralsuffizienz), einer systemischen Erkrankung des Herzens oder des Perikards, dem Zustand nach Chemotherapie mit Anthrazyklinen bei maligner Erkrankung oder anderen Kardiomyopathieformen wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Durchführung der Herzkatheteruntersuchung einschließlich einer Myokardbiopsie sowie der Teilnahme an der wissenschaftlichen Untersuchung über den Nachweis von Virus-Genomen im Myokard.

Von jedem Patienten wurden folgende Angaben und Befunde zu Beginn dieser Studie erfasst und dokumentiert:

1. Anamnese (insbesondere Stadium der chronischen Herzinsuffizienz [New York Heart Association])
2. Transthorakaler Echokardiographiebefund (insbesondere linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und linksventrikuläre Ejektionsfraktion)
3. Hämodynamik in der Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Koronarstatus und Endomyokardbiopsie
4. Enterovirusnachweis im Myokard
5. Histologische, histomorphometrische und immunhistologische Befunde der Myokardbiopsie
6. Ruhe-EKG
7. Herzfrequenzvariabilität im 24-Stunden-Langzeit-EKG
8. Druckwerte im kleinen Kreislauf in der Einschwemmkatheteruntersuchung in Ruhe und nach Ergometerbelastung im Liegen

3.2. Anamnese

Bei der Anamnese wurden Angaben über den Krankheitsbeginn der klinischen Symptome wie Dyspnoe, Angina pectoris-Symptomatik und Palpitationen, sowie die Medikamenten- und Alkoholanamnese erfasst. Das NYHA-Stadium der chronischen Herzinsuffizienz wurde anhand der Angaben der Patienten zu ihrer körperlichen Belastbarkeit festgelegt (Criteria Committee of the New York Heart Association, 1967).

Der Alkoholkonsum wurde mittels einer Skala von 0 – 3 eingeteilt (0 = kein Alkohol; 1 = selten; 2 = <50g/d; 3 = >50g/d). Die Einnahme anderer Drogen wurde von keinem Patienten angegeben.

3.3. Transthorakale Echokardiographie

Bei allen 64 Patienten wurde zur Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers [LVEDD in mm] und der linksventrikulären Auswurfraction [LVEF in %] routinemäßig ein transthorakales Echokardiogramm nach den Empfehlungen der American Society of Echocardiography (Schiller et al., 1989) von einem erfahrenen Untersucher durchgeführt. Dabei erfolgte auch die Beurteilung der Herzkinetik. Das Vorhandensein von Thromben und Perikardergüssen wurde ebenfalls dokumentiert.

3.4. Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchung und Endomyokardbiopsie

Bei allen in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurden 6–8 stecknadelkopfgroße von Mai 1996 bis November 1997 rechtsventrikuläre Myokardbiopsien aus dem apikalen Septumbereich, ab Dezember 1997 bis Juni 1999 ausschließlich linksventrikuläre Myokardbiopsien aus der freien posterolateralen Wand, mit einer langen Biopsiezange (Signus) von einem erfahrenen Untersucher entnommen und anschliessend sofort in flüssigem Stickstoff bei -80°C tief gefroren.

Des Weiteren wurde bei allen Patienten die angiographische Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und bei einem Großteil der Patienten die invasive Messung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), des pulmonalkapillären Druckes (PCWP), des Herzminutenvolumens (HMF), das enddiastolische Volumen (EDV in ml/min) und des Herzindex (CI; l/min/m² Körperoberfläche) mittels Thermomodulation in der bekannten Standardtechnik durchgeführt (Figulla et al., 1985).

3.5. Enterovirusnachweis

Um die Enterovirusgenome, insbesondere den nicht-kodierten hochkonservierten Bereich in der 5'-Region mittels komplementärer DNA durch die In-situ-Hybridisierung und anschließender enzymatischer Amplifikation mit entsprechenden Primern (PCR) in den Myokardbiopsien nachweisen zu können (Fujioka et al., 2000; Figulla et al., 1995; Why et al., 1994; Kandolf et al., 1987; Bowles et al., 1986), wurde zunächst die Isolierung der viralen RNA aus den tiefgefrorenen Endomyokardbiopsien im Institut für Virologie der Friedrich-Schiller-Universität (ehemaliger Direktor Prof. Dr. med. A. Stelzner) mittels der Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chlorophorm-Methode nach Chromczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Dafür wurde das gewonnene Gewebe gleichmäßig in einer 4M Guanidin-Thiocynat-Mercaptophenollösung homogenisiert. Die RNA wurde mit Hilfe von Phenol-Chlorophorm ausgefällt und mit Ethanol gewaschen (Lotze et al., 2001).

Anschliessend wurden 10µl der gewonnenen reinen RNA entnommen und in einem 20µl Reaktionsgemisch mittels oligo-dT Priming nach dem ds-Superscript-Protokoll (Live Technologies, Inc.) in cDNA umgewandelt. Die Unversehrtheit der extrahierten RNA wurde mittels einer reversen Transkriptions - Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) mit einem house keeping gene (GAPDH) überprüft.

Das Umschreiben der gewonnenen Enterovirus-RNA in cDNA erfolgte durch eine one-Step RT-PCR unter Verwendung des Titan™ One Tube RT-PCR Systems (La-Roche Diagnostics) und Primern, die den konservierten 5'-Bereich der Enteroviren erkennen (5'CGGTACCTTTGT GCGCCTGTTTTA-3' und 5'-CGGACACCCAAAGTA GTCGGTTCC-3').

Um die Sensitivität zu erhöhen und die Spezifität zu bestätigen, wurde anschließend unter Verwendung einer PCR-Produkt – spezifischen Sonde, eine Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dafür wurden PCR-generierte Digoxigenin-markierte DNA-Proben (DIG-11-dUTP, La-Roche Diagnostics) unter Verwendung von Enterovirus-spezifischen Primern (5'-

CCCCGGACTGAGTATCAATA-3' und CAGTTAGGATTAGCGGCAT TC-3') eingesetzt.

Ein Antikörper-Konjugat (Anti-DIG-AP; La-Roche Diagnostics) wurde hinzugefügt, und die Southern-Blot-Hybridisierung im 1,2%igen ethidiumbromidgefärbten Agarosagel wurde mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

3.6. Histologie, Histomorphometrie und Immunhistologie

3.6.1. Histologie

Die histologische Beurteilung der Endomyokardbiopsien erfolgte anhand der Dallas-Klassifikation (Aretz et al., 1984), die eine aktive Myokarditis beim kombinierten Auftreten von Myozytolysen und zellulären Entzündungsinfiltraten definiert. Die Abwesenheit von entzündlichem Infiltrat und Myozytennekrosen wurde als Ausschluss einer Myokarditis bewertet

Die histologische Beurteilung der Endomyokardbiopsien erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Mall vom Pathologischen Institut des Klinikums Darmstadt. Die Myokardbiopsien wurden in Paraffin fixiert und nach Standardmethoden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Es wurden nur Patienten, bei denen sich nach neuen Kriterien (WHO Expert Committee on Histology of Inflammatory and Viral Cardiomyopathy, 1997) das histologische Bild einer DCM zeigte, in diese Studie eingeschlossen.

3.6.2. Histomorphometrie

Die histomorphometrischen Untersuchungen der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Endomyokardbiopsien wurden ebenfalls an Paraffinschnitten von dem Pathologischen Institut des Klinikums Darmstadt durch Herrn Prof. Dr. Mall

vorgenommen. Die Bestimmung der Myozytendurchmesser erfolgte in erster Linie in Höhe des Zellkerns im Längsschnitt der Myozyten. Falls die Myozyten quer getroffen waren, wurde der Durchmesser im Querschnitt berechnet. Es wurden mindestens 25 Einzelmessungen zur Bestimmung des mittleren Myozytendurchmessers durchgeführt.

Der prozentuale Fibroseanteil in den Endomyokardbiopsien, die mit Siriusrot, einer speziellen Kollagenfärbung gefärbt wurden, wurde anhand von Standardtechniken mittels dem sog. „point counting“ bestimmt (Figulla et al., 1995).

3.6.3. Immunhistologie

Bei allen Patienten wurde die Infiltration des Myokards mit Entzündungszellen beurteilt. Zusätzlich erfolgte die semiquantitative Beurteilung der Expression der Major-Histocompatibility-Komplex Antigene der Klassen I und II (HLA-A,B,C und HLA-DR) (Noutsias et al., 2003; Maisch et al., 2000; Kühl et al., 1996; Kühl et al., 1994; Chow et al., 1989).

Zur Analyse der immunhistologischen Aktivität im Myokard bei Patienten mit DCM wurde im kardiologischen Labor der Inneren Medizin I der Friedrich-Schiller-Universität Jena die Infiltration mit Entzündungszellen (Makrophagen, Lymphozyten) in den gewonnenen Myokardbiopsien an 4 µm-dicken, acetonfixierten und in tissue tec eingedeckten Gefrierschnitten (-80°C) untersucht (Lotze et al., 2001).

Dabei wurden die monoklonalen Antikörper anti-CD2 (pan T-Zellen Marker), anti-CD4 (T-Helfer Zellen), anti-CD8 (T-Suppressor Zellen), anti-CD14 (Makrophagen) und anti-CD45RO (aktivierte T- Lymphozyten); (alle DAKO Diagnostika, Hamburg, Germany) als primäre Antikörper eingesetzt.

Die Myokardbiopsien wurden für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden sie mit einem biotinylierten Zweitantikörper für weitere 30 min inkubiert, erneut gewaschen und danach mit einem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® Elite ABC Kit, VECTOR, Laboratories, Burlingame, USA) nochmals für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS (phosphat buffer saline). Als Chromogen wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Histoprime, CAMON Laboratory Service, Wiesbaden, Germany) verwendet. Die Schnitte wurden nach dem Waschen mit Hämalaun für eine Minute gefärbt, fünf Minuten in PBS gebracht und dann in Glycerol-Gelatine eingebettet.

Die infiltrierenden Zellen wurden pro Gesichtsfeld ($GF=0,125\text{mm}^2$) unter dem Mikroskop (Axiolab ZEISS, Jena, Germany; x40 Objektiv, x10 Okular) bei 400facher Vergrößerung beurteilt. Pro Patient wurden mindestens 15 GF ausgezählt. Die mittlere Anzahl der jeweiligen Entzündungszellen wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Zur weiteren Differenzierung wurde die Expression der Major-Histocompatibility-Komplex Antigene der Klasse I (HLA-A, B, C) und Klasse II (HLA-DR) mit primären Antikörpern (HLA-ABC Antigen Clone W6/32, DAKO, Glostrup, Dänemark und HLA-DR, Becton-Dickinson Co., Mountain View, USA) und einem biotinylierten Zweitantikörper sowie einem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® Elite ABC Kit, VECTOR Laboratories, Burlingame, USA) und AEC-Rot als Chromogen (Histoprime Peroxidase Substrakit-ACE (Red), Linaris, Biological Products, Bettingen, Deutschland) an den Kryostatschnitten ($4\mu\text{m}$) untersucht. Die spätere Beurteilung erfolgte semiquantitativ bei 400facher Vergrößerung an dem gleichen Mikroskop ([0]=negativ, [(+)]=fraglich positiv, [+=]schwach positiv, [++]=positiv, [+++]=stark positiv).

Der sogenannte „Entzündungsindex“ wurde aus der Summe aller Mittelwerte der T-Lymphozyten und Makrophagen und den semiquantitativen Daten über die Expression der Klasse I und II MHC-Antigene errechnet.

3.7. Herzfrequenzvariabilität

Bei der ersten stationären Aufnahme wurde bei allen 64 Patienten ein 24-Stunden-Holter-Monitoring mit den Rekordern Reynolds Sherpa (Reynolds, Feucht, Deutschland) oder Ela Syneflash (Ela medical, Montrouge, Frankreich) zur Registrierung von Herzrhythmusstörungen und Analyse der Herzfrequenzvariabilität durchgeführt. Anschließend erfolgte die computergestützte Auswertung mit dem Analysegerät Elatec V3.03F (Ela medical, Montrouge, Frankreich).

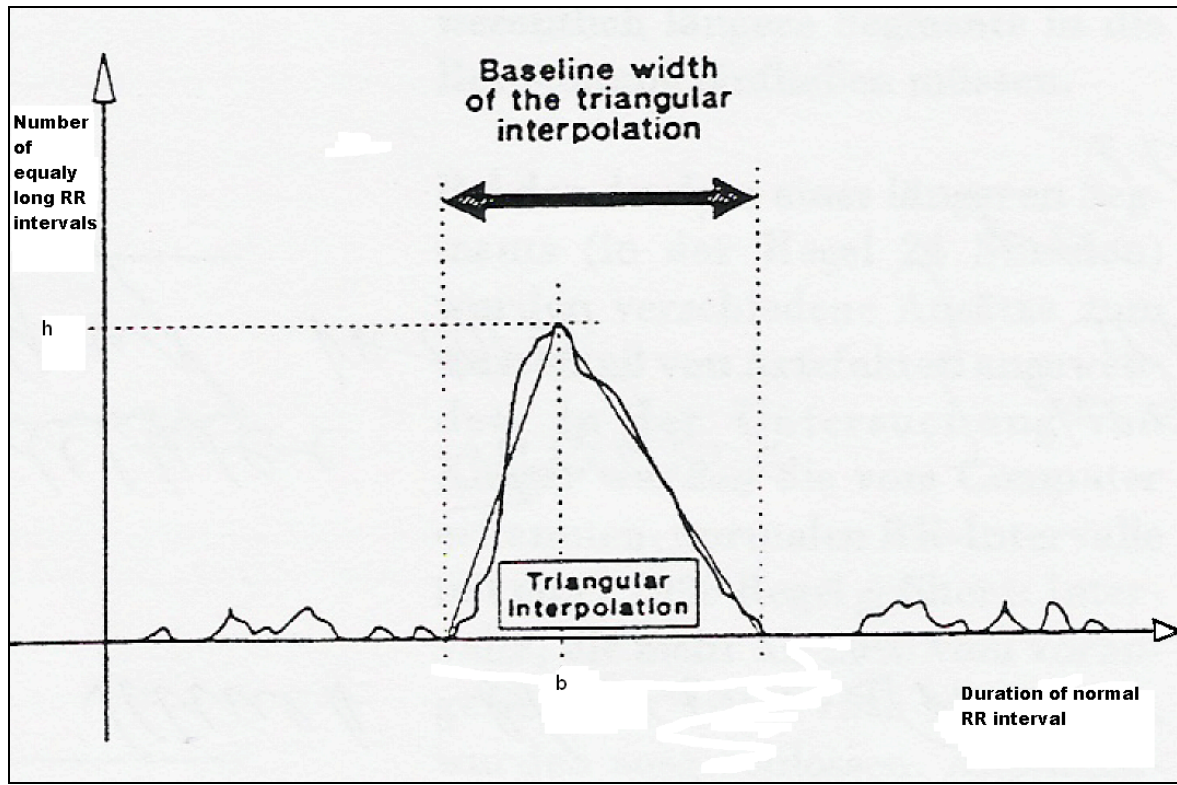
Durch die gemessenen Parameter der Herzfrequenzvariabilität (HRV) konnten weitere nicht-invasive Prognoseparameter analysiert werden. Unter der HRV versteht man Schwankungen der Herzfrequenz über einen längeren Messzeitraum bei der Analyse von Herzschlag zu Herzschlag (RR). Bei der zeitbezogenen Messung („time domain analysis“) werden die Intervalle der Herzaktionen über die Zeit bestimmt und daraus Mittelwerte (z.B. Mittelwert aller RR-Intervalle = RRI) und Standardabweichungen (z.B. Standardabweichung der Länge aller RR-Intervalle = SDNN) ermittelt und geometrische Größen (z.B. Triangel – Index = HRV – TI) berechnet (Farrell et al., 1991). Die Auswertung der HRV-Parameter im Zeitbereich wurden in der vorliegenden Studie für den RRI, die SDNN und den HRV – TI durchgeführt.

Der HRV-TI ist ein Integral der Dichteverteilung (Anzahl der RR-Intervalle [Fläche] dividiert durch das Maximum [Höhe] der Dichteverteilung) (Abbildung 2). Ein Wert <20 bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt ist Ausdruck einer gestörten kardialen autonomen Funktion und korreliert mit einer linksventrikulären Funktionsstörung (Löllgen, 1999). Ein verminderter HRV-TI weist somit auf eine erhöhte Gefährdung durch ventrikuläre Rhythmusstörungen sowie auf einen plötzlichen Herztod hin (Malik, 1996; Algra et al., 1993; Farrell et al., 1991).

Eine SDNN $<50\text{ms}$ gilt als Ausdruck einer hochgradigen Störung der sympathiko-vagalen Balance und wurde ebenfalls als prognostisch ungünstiger Parameter hinsichtlich der Gesamtsterblichkeit nach akutem Myokardinfarkt

(Kleiger et al., 1987) und bezüglich des plötzlichen Herztodes bei DCM (Przibille et al., 1998) eingestuft.

Abbildung 2:



Methode der Dreiecks-Interpolation zur Berechnung des HRV - TI bei Vorhandensein von Artefakten. Die Grundlinienbreite des Hauptmaximums im Diagramm der Schagintervall-Häufigkeitsdichteverteilung wird mit Hilfe einer einfachen arithmetischen Formel zur Berechnung der Fläche eines Dreiecks ($A = b/2 \cdot h$) ermittelt. Die Fläche entspricht der Gesamtzahl erkannter Schläge. Da der Anteil artefaktischer Schläge relativ zur Gesamtzahl ziemlich gering ist, entspricht der Wert annähernd der Gesamtzahl korrekt erkannter, normaler RR-Intervalle. Die Basis des Dreiecks entspricht der zu messenden Größe [b], die Höhe [h] wird einfach durch die Dreiecks-Interpolation ermittelt und entspricht der Frequenz des am häufigsten beobachteten Intervalls, der modalen Schlagintervall-Frequenz (Farrell et al., 1991).

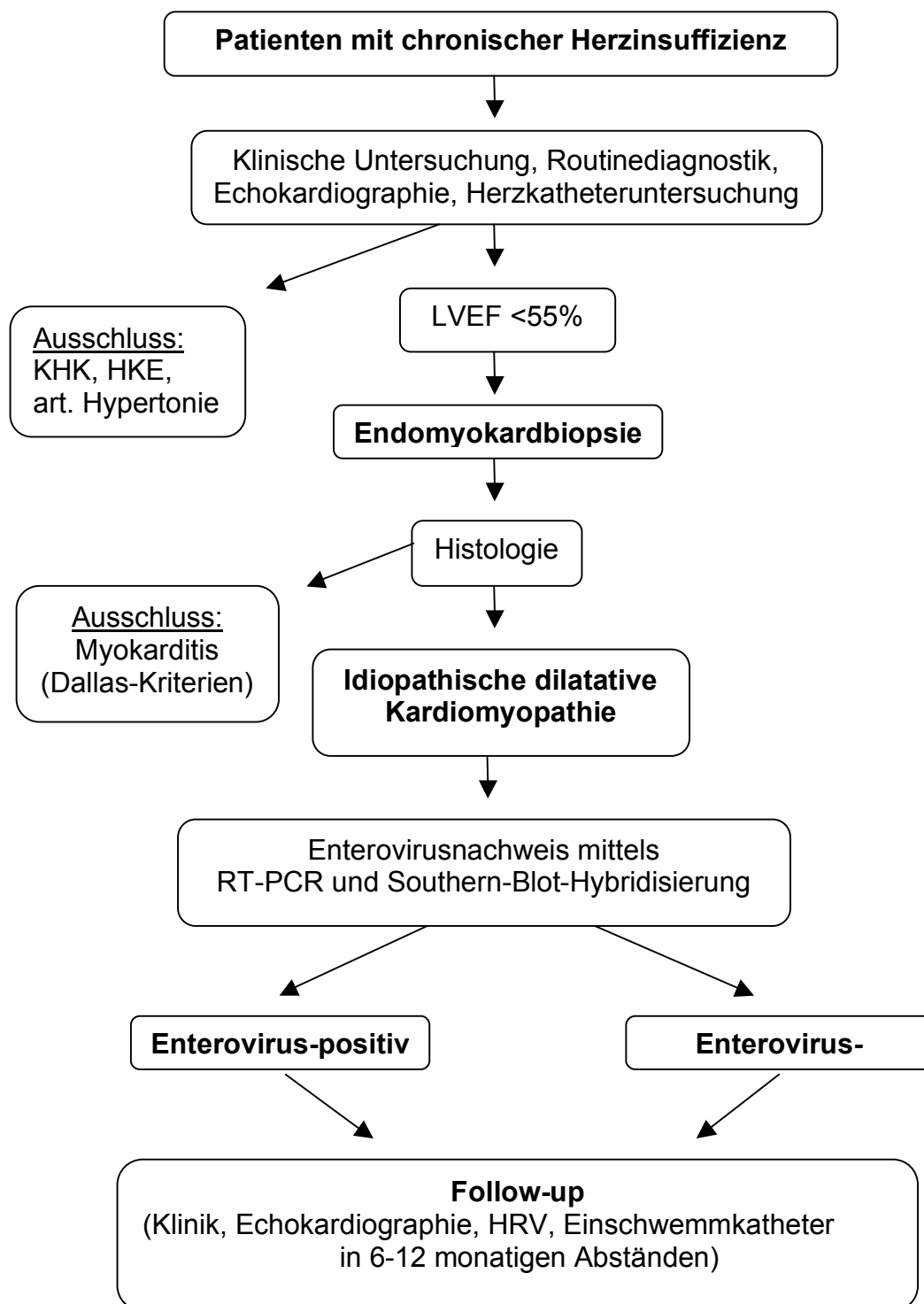
3.8. Einschwemmkatheteruntersuchung

Bei einem großen Teil der Patienten mit idiopathischer DCM wurde eine Einschwemmkatheteruntersuchung durchgeführt, bei der der mittlere pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (PCWP) in Ruhe und nach Belastung bestimmt werden konnte. Bei der gleichen Untersuchung konnte ebenfalls der pulmonal-arterielle Druck (PAP) in Ruhe und nach Ergometerbelastung im Liegen gemessen werden. Der physiologische Druck der A. pulmonalis in Ruhe beträgt systolisch ca. 20-25 mmHg und diastolisch ca. 9-12 mmHg. Der mittlere Druck liegt bei ca. 14 mmHg (Busse, 1995). Ein systolischer Wert >30mmHg und ein mittlerer pulmonal-arterieller Druck >20 mmHg in Ruhe wurden als pathologisch eingestuft.

3.9. Follow-up

In sechs bis 12 monatigen Abständen wurden die Patienten mit DCM in der Klinik für Innere Medizin I der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Zeitraum von November 1998 bis Juni 2000 stationär oder ambulant nachuntersucht. Ziel der vorliegenden Studie war es, einen Nachbeobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten zu erreichen (Abbildung 3). Bei jeder Kontrolluntersuchung wurde die NYHA-Klasse anhand der klinischen Symptomatik der Patienten dokumentiert und die aktuelle Medikamentenanamnese erhoben.

Als weitere Verlaufsparemeter dienten in erster Linie die wiederholte echokardiographische Bestimmung des LVEDD und der LVEF. Ergänzend wurden die Herzfrequenzvariabilität mittels 24-Stunden Langzeit-Elektrokardiogramm und die Druckwerte im kleinen Kreislauf im Verlauf analysiert. Die Daten wurden anschliessend vergleichend für beide Gruppen ausgewertet.

Abbildung 3:

Studienprotokoll zur Untersuchung der prognostischen Bedeutung von enteroviraler RNA im Myokard bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (HKE = Herzklappenerkrankung; HRV = Heart Rate Variability; KHK = koronare Herzerkrankung, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion; RT-PCR = reverse Transkriptase – Polymerase – Kettenreaktion)

3.10. Statistik

Die gesammelten Daten wurden in ein Microsoft Excel Datenblatt eingegeben, anschließend wurden die Berechnungen und Grafiken erstellt. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS for Windows 10 durchgeführt.

Kontinuierliche Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, Gruppenvariablen als relative Häufigkeit (Prozente). Für Vergleiche zwischen der Enterovirus-positiven Gruppe und der Enterovirus-negativen Gruppe wurde der ungepaarte t-Test für unabhängige Stichproben (Student's t-Test) und Kreuztabellen verwendet. Um für beide Gruppen vergleichend den mittleren Unterschied zum Ausgangswert zu bestimmen, wurde die Differenz zwischen dem letzten Follow-up Wert und der ersten Untersuchung bestimmt. Anschliessend wurde der Gruppenvergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Für abhängige Stichproben zur Verlaufskontrolle wurde der paarige t-Test genutzt. Alle Tests zur Analyse der exakten Signifikanz wurden 2-seitig vorgenommen.

Waren die Ergebnisse nicht normal verteilt, wurde der exakte Test nach Fisher und der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet. Für den Vergleich des Langzeitverlaufes der NYHA-Klassen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Überlebenskurve der Patienten wurde mit der Kaplan-Meier Analyse erstellt, der Unterschied zwischen den Gruppen wurde mittels log-rank Test errechnet. Als statistisch signifikant wurde ein Unterschied ab einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Enterovirusnachweis

Insgesamt wurden 64 Patienten (55 Männer, 9 Frauen; mittleres Alter 51 ± 11 Jahre) im Zeitraum von Mai 1996 bis Juni 1999 mit der klinischen Diagnose einer idiopathischen DCM (mittlere LVEF $30,8\% \pm 10,1\%$) nach Ausschluss einer akuten oder chronischen Myokarditis anhand der Dallas-Kriterien (Aretz et al., 1987) und der neuen WHO-Klassifikation (Richardson et al., 1996) in die vorliegende Studie einbezogen.

Bei 26/64 Patienten (41%) mit DCM wurde mittels einer Enterovirus-spezifischen PCR und Southern-Blot-Hybridisierung Enterovirus-RNA in den Myokardbiopsien nachgewiesen. Dabei fanden sich in 11/25 (44%) rechtsventrikulären und in 15/39 (39%) linksventrikulären Endomyokardbiopsien Enterovirus-Genome, so dass sich hinsichtlich des Enterovirusnachweises kein signifikanter Unterschied zwischen dem rechten und dem linken Ventrikel zeigte ($p = 0,66$).

Bei 38/64 Patienten (59%) mit DCM fand sich eine negative Enterovirus-spezifische PCR. Dementsprechend wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt:

1. Patienten mit positiver Enterovirus-spezifischer PCR
→ Enterovirus-positive Gruppe (n = 26)
2. Patienten mit negativer Enterovirus-spezifischer PCR
→ Enterovirus-negative Gruppe (n = 38)

4.2. Klinische Daten

Zu Studienbeginn ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der klinischen Basisdaten wie Alter, Geschlecht, Dauer der Symptome vor stationärer Aufnahme, vorhandenem Linksschenkelblock und des NYHA-Stadiums (Tabelle 1). Nur die Prävalenz von

Vorhofflimmern wurde in der Enterovirus-positiven Gruppe signifikant häufiger diagnostiziert ($p = 0,04$).

Allerdings zeigten sich Unterschiede bei den Angaben über den Alkoholkonsum. Die Enterovirus-positive Gruppe gab häufiger an, selten Alkohol (z.B. nur bei Familienfeiern) zu konsumieren ($p = 0,002$), wohingegen bei der Enterovirus-negativen Gruppe über eine regelmäßige Alkoholaufnahme von weniger als 50g/d in 42% der Fälle berichtet wurde ($p = 0,02$).

Die Therapie der DCM erfolgte anhand des klinischen Schweregrades nach den neuen Richtlinien der Herzinsuffizienztherapie (Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology, 2001) mit ACE-Hemmern, Diuretika, Digitalis und β -Blockern. Die medikamentöse Behandlung war in beiden Patientengruppen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vergleichbar.

Patienten mit Vorhofflimmern oder einer Ejektionsfraktion $<35\%$ waren zur oralen Antikoagulation auf Phenprocoumon eingestellt. Ein Patient aus der Enterovirus-negativen Gruppe hatte wegen vorangegangenen Kammerflimmern einen AICD (Automatic Implantable Cardioverter Defibrillator) erhalten.

Tabelle 1: Klinische Basisdaten der Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (n=64)

Parameter	EV-positiv (n = 26)	EV-negativ (n = 38)	p-Wert
Alter (Jahre)*	52 ± 12	50 ± 11	0,55
Männer (%)	22 (85)	33 (87)	0,72
Symptomdauer (Monate)*	8,2 ± 10	6,5 ± 8	0,43
Linksschenkelblock (%)	8 (31)	13 (34)	0,47
Vorhofflimmern (%)	13 (50)	8** (22)	0,02
<u>NYHA-Klassifikation</u>			
I (%)	1 (4)	4 (11)	0,51
II (%)	7 (27)	12 (32)	
III (%)	17 (65)	19 (50)	
IV (%)	1 (4)	3 (8)	
<u>Alkoholkonsum</u>			
Keiner (%)	1 (4)	4 (11)	0,49
Selten (%)	16 (62)	8 (21)	0,002
<50g/d (%)	4 (15)	16 (42)	0,02
>50g/d (%)	5 (19)	10 (26)	0,34
<u>Medikamente</u>			
ACE- Hemmer (%)	26 (100)	37 (97)	0,59
Diuretika (%)	21 (81)	32 (84)	0,74
Digitalis (%)	18 (69)	29 (76)	0,80
ß- Blocker (%)	19 (73)	28 (74)	0,61

*Daten als Mittelwert ± Standardabweichung; ** 1 Patient mit AICD (Automatic Implantable Cardioverter Defibrillator) nicht in die Auswertung eingeschlossen; NYHA = New York Heart Association; ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme

4.3. Histologie und Histomorphometrie

Bei allen Patienten erfolgte der histologische Ausschluss einer akuten Myokarditis anhand der Dallas-Kriterien (Aretz et al., 1987). Bei der morphometrischen Analyse der Myokardbiopsien konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Myozytendurchmesser und des Fibroseanteils festgestellt werden (Tabelle 2).

4.4. Immunhistologie

Bei der semiquantitativen Beurteilung der Expression der Major Histocompatibility Complex (MHC) Antigene der Klassen I und II zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Ebenso ergaben sich keine Ungleichheiten hinsichtlich der Anzahl der T-Lymphozyten, der T-Helferzellen, Makrophagen und der aktivierten Lymphozyten pro Gesichtsfeld ($0,125\text{mm}^2$), so dass sich der errechnete Entzündungsindex ebenfalls nicht signifikant unterschied. Der mittlere „inflammatory index“ aller Patienten betrug $9,5 \pm 5,8$ (Tabelle 2).

Tabelle 2: Histomorphometrie und Immunhistologie der Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (n=64)

Parameter	EV-positiv (n = 26)	EV-negativ (n = 38)	p-Wert
<u>Histomorphometrie</u>			
Myozytendurchmesser (µm)	24 ± 7 (n=25)	24 ± 6 (n=35)	0,68
Fibroseanteil (%)	6,35 ± 5,4 (n=14)	5,5±5,2 (n=15)	0,67
<u>Immunhistologie</u>			
	(n= 25)	(n = 36)	
CD 2	0,5 ± 0,6	0,5 ± 0,8	0,91
CD 4	1,5 ± 1,5	1,3 ± 1,2	0,54
CD 8	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,4	0,57
CD 14	1,9 ± 2,2	1,7 ± 3,3	0,82
CD 45 R0	3,0 ± 1,7	2,8 ± 1,7	0,70
<u>MHC Klasse I (HLA - A, B, C)*</u>			
negativ [0]	0	1	0,40
fraglich positiv [(+)]	1	0	0,23
schwach positiv [+]	16	25	0,77
positiv [++]	8	10	0,74
<u>MHC Klasse II (HLA - DR)*</u>			
fraglich positiv [(+)]	1	1	1,00
schwach positiv [+]	22	33	0,64
positiv [++]	2	2	0,70
<u>Entzündungsindex</u>	9,2 ± 4,8	8,9 ± 6,8	0,85

*Zellen pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung; ein Gesichtsfeld entspricht 0,125mm;

MHC = Major Histocompatibility Complex

4.5. Nicht-invasive Diagnostik

4.5.1. Echokardiographische Parameter

Bei der bei allen 64 Patienten routinemäßig durchgeführten echokardiographischen Bestimmung der LVEF und des LVEDD ergaben sich zu Beginn der Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Gruppe. In beiden Gruppen konnte eine klare Einschränkung der linksventrikulären Auswurfraction und deutliche Dilatation des linken Ventrikels festgestellt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Echokardiographische Parameter

Parameter	EV- positiv (n=26)	EV- negativ (n=38)	p-Wert
LVEDD (mm)	67 ± 8	68 ± 7	0,67
LVEF (%)	30 ± 10	39 ± 9	0,69

LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion

4.5.2. Parameter der Herzfrequenzvariabilität im Zeitbereich

Bei 42 Patienten mit Sinusrhythmus wurde die mittlere Herzfrequenz in Ruhe (HF) und das mittlere RR-Intervall (RRI) ermittelt. Durch die Verwendung des Rekorders ELA Syneflash (Ela medical, Montrouge, Frankreich) konnten bei 32 Patienten zwei weitere Parameter der Herzfrequenzvariabilität im Zeitbereich, nämlich die Standardabweichung des mittleren RR-Abstandes (SDNN) und der Triangelindex (HRV-TI), bestimmt werden (Abbildung 4). Hierbei waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Gruppe nachweisbar (Tabelle 4). Die Daten von 22

Patienten wurden aufgrund von vorhandenem Vorhofflimmern (n=21) oder AICD-Implantation (n=1) von der Auswertung ausgeschlossen.

Tabelle 4: Parameter der Herzfrequenzvariabilität im Zeitbereich

Parameter	EV-positiv (n = 26)	EV- negativ (n = 38)	p-Wert
HF (1/min)	85 ± 22 (n=13)	86 ± 19 (n=29)	0,87
RRI (ms)	722 ± 119 (n=13)	702 ± 160 (n=29)	0,69
SDNN (ms)	102 ± 59 (n=10)	116 ± 43 (n=22)	0,47
TI – HRV	36 ± 18 (n=10)	53 ± 26 (n=22)	0,08

HF = Herzfrequenz; RRI = mittleres RR-Intervall; SDNN = Standardabweichung des mittleren RR-Abstandes; TI – HRV= Triangelindex

4.6. Invasive Diagnostik

4.6.1. Hämodynamische Parameter in Ruhe

Bei allen 64 Patienten wurde bei der ersten stationären Aufnahme eine Linksherzkatheteruntersuchung mit Koronarangiographie und Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt, sowie eine Myokardbiopsie aus dem rechten (n=25) oder linken Ventrikel (n=39) zur Diagnosesicherung entnommen.

Bezüglich der hämodynamischen Messungen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten der beiden Gruppen erkennbar (Tabelle 5).

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter in Ruhe

Parameter	EV-positiv (n = 26)	EV- negativ (n = 38)	p- Wert
LVEF (%)	36 ± 13 (n=26)	38 ± 11 (n=36)	0,81
HMV (l/min)	5,6 ± 1,5 (n=18)	5,4 ± 1,5 (n=26)	0,66
HI (l/min/m ² KÖF)	2,8 ± 0,8 (n=18)	2,7 ± 0,7 (n=25)	0,72
EDV (ml/m)	114 ± 16 (n=14)	117 ± 40 (n=22)	0,81
SVI (ml/m ²)	43 ± 16 (n=12)	41 ± 15 (n=20)	0,74
PAPm(mmHg)	25 ± 10 (n=18)	25 ± 11 (n=27)	0,79
PCWPm(mmHg)	18 ± 11 (n=20)	17 ± 10 (n=27)	0,85

Mittelwert ± Standardabweichung, KÖF = Körperoberfläche; LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, HMV = Herzminutenvolumen, HI = Herzindex, EDV = Enddiastolisches Volumen, SVI = Schlagvolumenindex, PAPm = mittlerer pulmonal-arterieller Druck, PCWPm = mittlerer pulmonal-kapillärer Verschlussdruck

4.6.2. Hämodynamische Parameter unter Belastung

Bei 32 Patienten wurde eine Einschwemmkatheteruntersuchung zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter vorgenommen. Bei 27 Patienten konnte der pulmonal-arterielle Mitteldruck (PAPm in mmHg) in Ruhe und nach Belastung und bei 32 Patienten der mittlere pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (PCWPm in mmHg) in Ruhe und bei 21 Patienten nach Belastung bestimmt werden. Diese hämodynamischen Messwerte differierten ebenfalls nicht zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Initiale Hämodynamik in der Einschwemmkatheteruntersuchung

Parameter	EV-positiv (n = 26)	EV- negativ (n = 38)	p- Wert
PCWPm Ruhe (mmHg)	16 ± 7 (n=17)	16 ± 10 (n=15)	0,98
PCWPm Belastung (mmHg)	32 ± 10 (n= 9)	31 ± 6 (n=14)	0,86
PAPm Ruhe (mmHg)	19 ± 7 (n=11)	25 ± 12 (n=16)	0,14
PAPm Belastung (mmHg)	46 ± 11 (n=11)	49 ± 9 (n=16)	0,45

PCWP = mittlerer pulmonal-kapillärer Verschlussdruck; PAPm = pulmonal-arterieller Mitteldruck

4.7. Follow-up

4.7.1. Patienten

Insgesamt konnten 63/64 Patienten (55 Männer [8 Frauen]; mittleres Alter 51 ± 11 Jahre) mit der klinischen Diagnose einer DCM in die Verlaufskontrolle einbezogen werden. Ein Patient war unbekannt verzogen und konnte nicht nachverfolgt werden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 23,0 ± 9,1 Monate (Spannbreite 12 – 46 Monate). Die Zeiträume unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

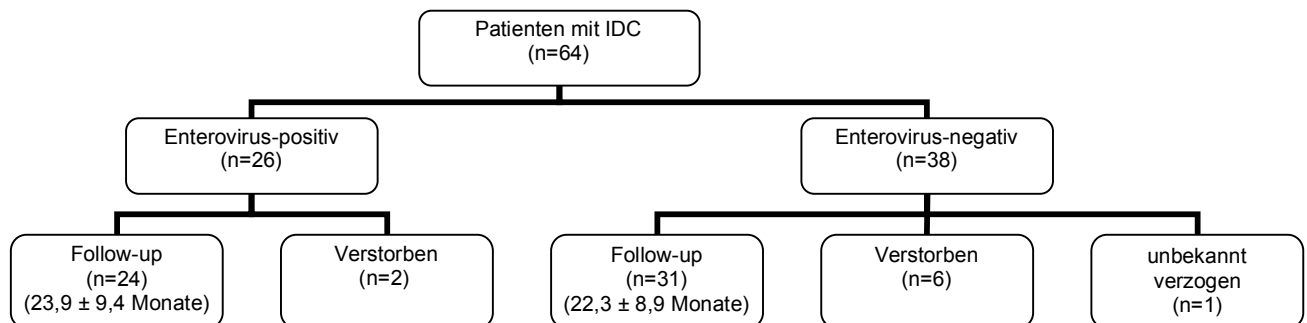
Sechzig Patienten wurden im Zeitraum von November 1998 bis Juni 2000 in der Klinik für Innere Medizin I der Friedrich-Schiller-Universität Jena ambulant oder stationär nachuntersucht. Drei Patienten wurden in einem anderen Krankenhaus oder von einem niedergelassenen Kardiologen weiter betreut und lehnten aus diesem Grunde eine erneute Kontrolle in der Klinik für Innere Medizin I der Friedrich-Schiller-Universität in Jena ab. Die anamnestischen sowie klinischen Angaben dieser drei Patienten und die zur Verfügung gestellten Echokardiogramme wurden in die Auswertung mit einbezogen (Abbildung 4).

4.7.2. Mortalität

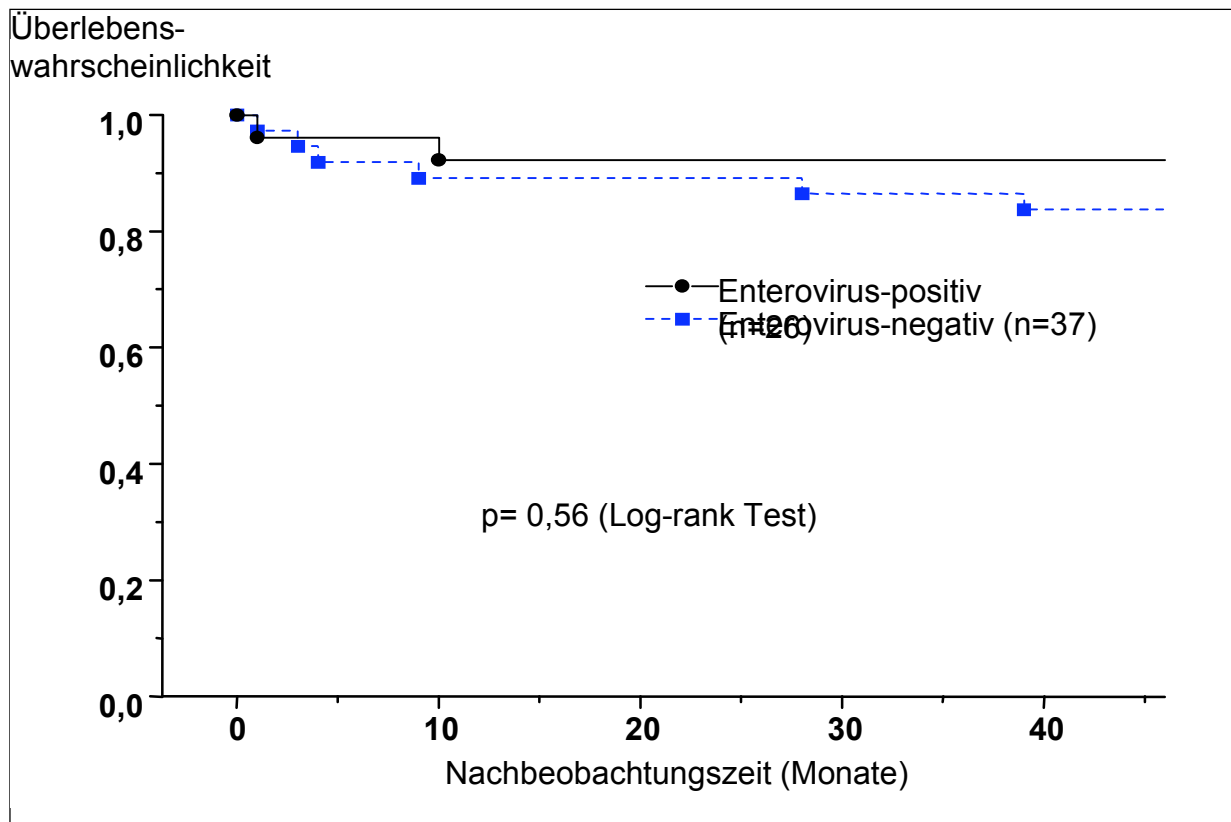
Während des Beobachtungszeitraumes verstarben 8/63 (13%) Patienten auf Grund einer kardialen Ursache, andere Todesursachen wurden nicht angegeben. Somit betrug die Gesamtmortalität in diesem Studienkollektiv während des Beobachtungszeitraumes ebenfalls 13% (8/63). Bei keinem Patienten wurde eine Herztransplantation durchgeführt (Abbildung 4).

Von den acht verstorbenen Patienten gehörten zwei Patienten (8%) der Enterovirus-positiven Gruppe (Tod nach 1 und 10 Monaten) und sechs Patienten (16%) der Enterovirus-negativen Gruppe (Tod nach 1, 3, 4, 9, 28 und 39 Monaten) an, so dass andeutungsweise eine höhere kardiale Mortalitätsrate bei den Enterovirus-negativen Patienten erkennbar war. Der Unterschied der Häufigkeit der aufgetretenen kardialen Todesfälle zwischen den beiden Gruppen erwies sich in der Kaplan-Meier Analyse allerdings als nicht signifikant (Abbildung 5).

Abbildung 4:



Übersichtsschema zum Follow-up der in die Studie aufgenommenen Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (n=64)

Abbildung 5:

Kaplan-Meier Überlebenskurven der Patienten mit Enterovirus-positiver und Enterovirus-negativer dilatativer Kardiomyopathie (Follow-up 23 ± 9 Monate)

4.7.3. NYHA-Klassifikation

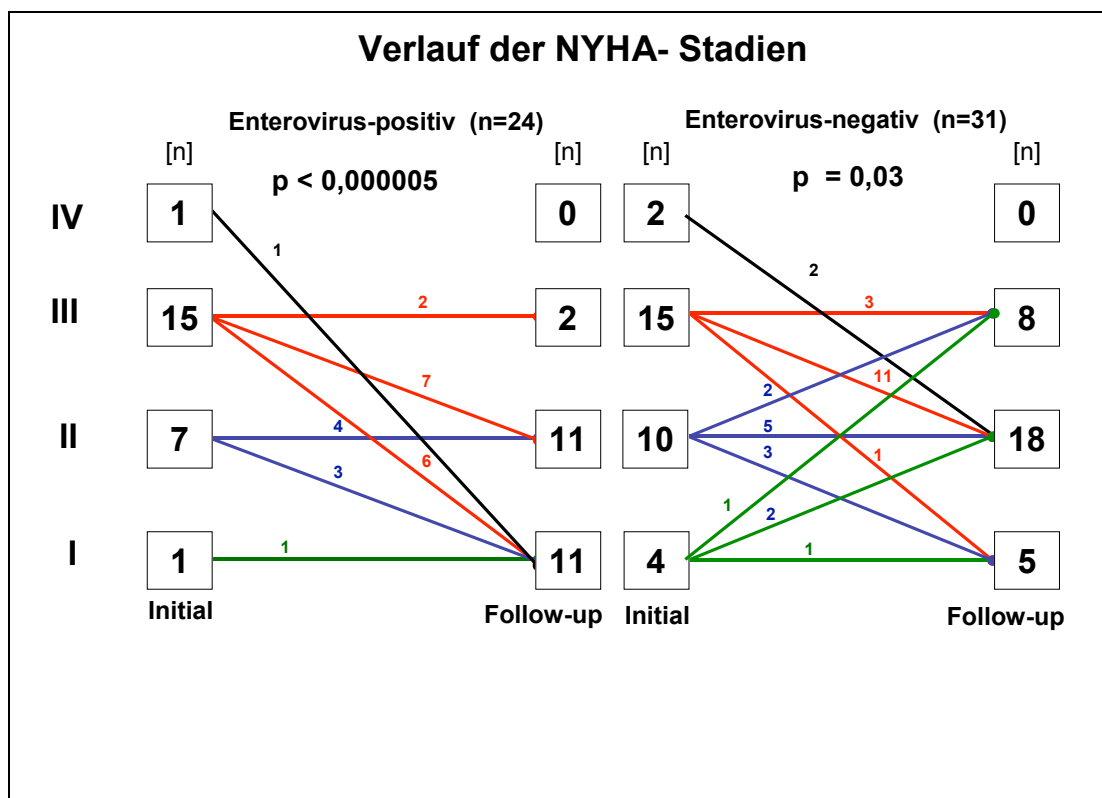
Bei den 55 überlebenden nachkontrollierten Patienten zeigte sich bezüglich der subjektiven körperlichen Belastbarkeit sowohl in der Enterovirus-positiven, als auch in der Enterovirus-negativen Gruppe eine signifikante Verbesserung der NYHA-Klassifikation (Abbildung 6).

Bei der Enterovirus-positiven Gruppe hatte ein Patient als Ausgangswert die NYHA-Klasse IV, welche im Verlauf in die NYHA-Klasse I wechselte. Insgesamt 15 Enterovirus-positive Patienten gaben eine NYHA-Klasse III an, die sich während des Nachbeobachtungszeitraumes zu einer NYHA-Klasse I (6/15) und II (7/15) verbesserte. Bei nur zwei Patienten waren keine Änderungen der subjektiven körperlichen Belastbarkeit feststellbar. In der Enterovirus-negativen

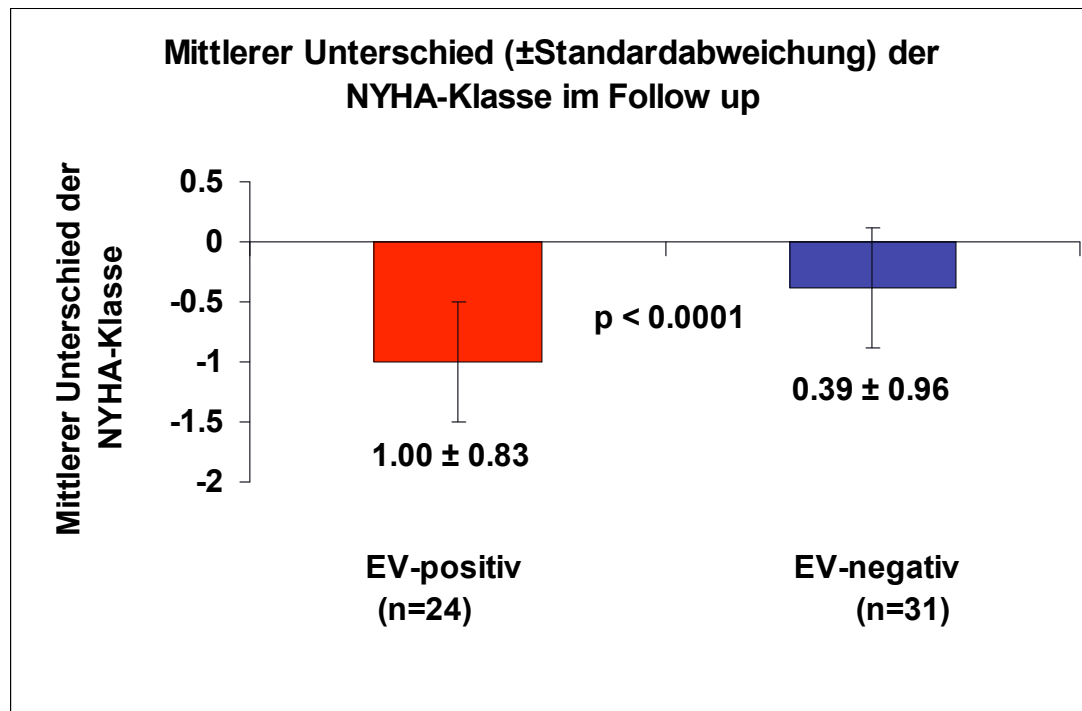
Gruppe befanden sich zwei Patienten zu Studienbeginn in der NYHA-Klasse IV, die sich während des Nachbeobachtungszeitraumes in die NYHA-Klasse II veränderte. Ebenfalls 15 Patienten waren initial in der NYHA-Klasse III, welche sich in die NYHA-Klasse I (1/15) und II (11/15) abwandelten. Bei drei Patienten aus der NYHA-Klasse III waren keine Veränderungen der Herzinsuffizienzsymptomatik erkennbar.

Insgesamt verbesserte sich die Enterovirus-positive Gruppe im Verlauf hochsignifikant ($p < 0,000005$), aber auch bei der Enterovirus-negativen Gruppe war eine eindeutige Zunahme der subjektiv empfundenen körperlichen Belastbarkeit nachweisbar ($p = 0,03$). Der errechnete mittlere Unterschied der NYHA-Stadien zwischen den Ausgangs- und Follow-up-Werten der Enterovirus-positiven gegenüber den Enterovirus-negativen Patienten zeigte eine signifikante Verbesserung ($p < 0,0001$) der NYHA-Klasse zugunsten der Enterovirus-positiven Patienten (Abbildung 7).

Abbildung 6:



Verlauf der NYHA-Stadien im Follow-up (23 ± 9 Monate) bei den Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Patienten mit DCM

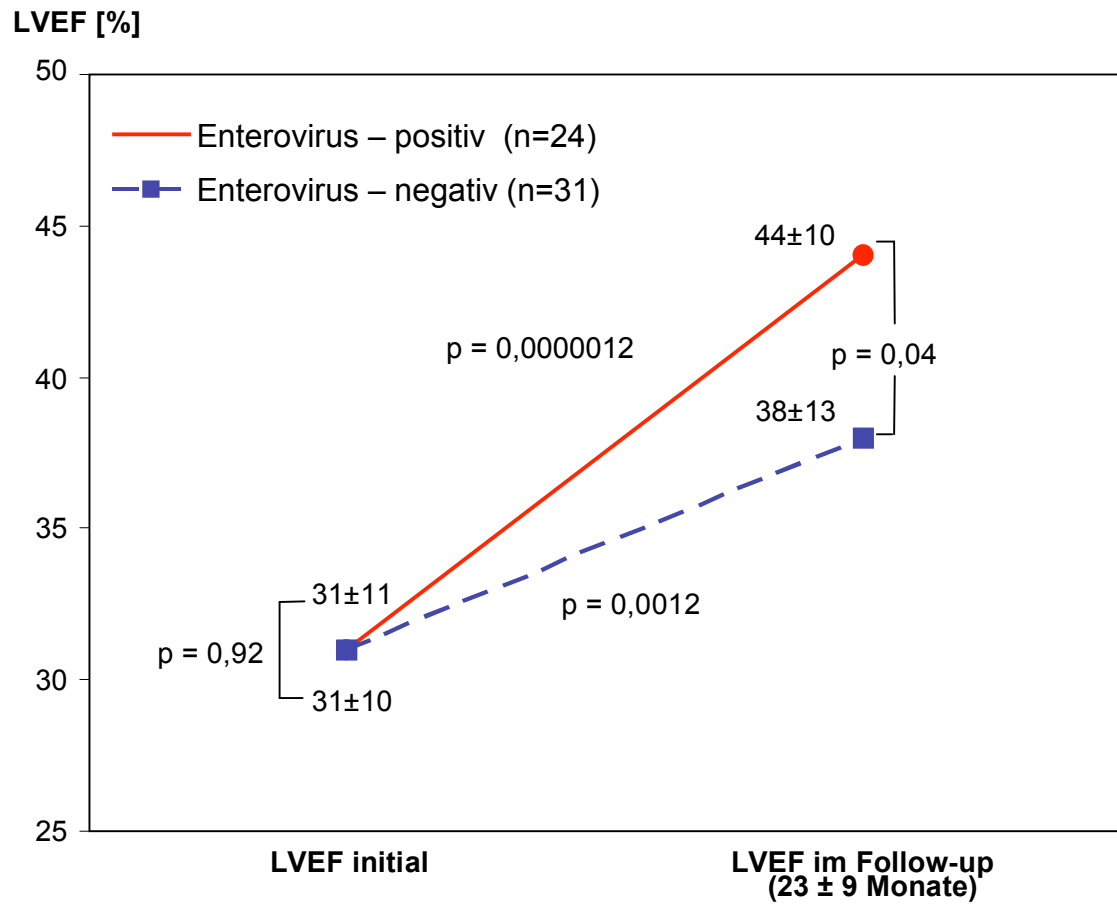
Abbildung 7:

Mittlerer Unterschied (±Standardabweichung) der NYHA-Klassen zwischen Ausgangs- und Follow-up Werten der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Patienten mit DCM

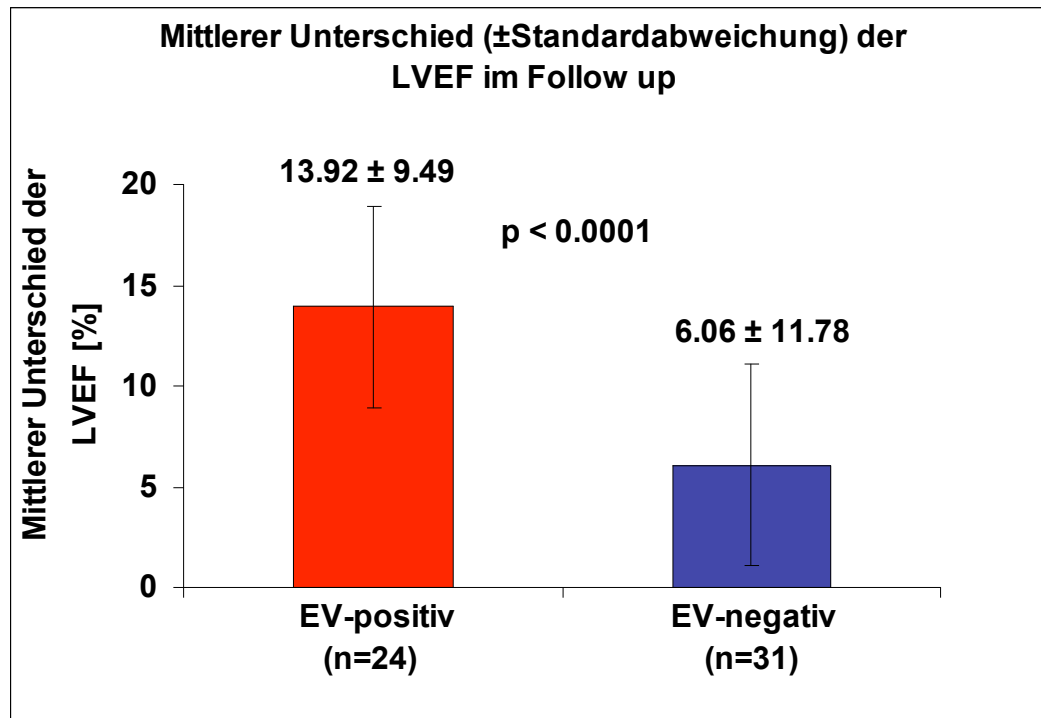
4.7.4. Follow-up der nicht-invasiven Diagnostik

4.7.4.1. Echokardiographische Parameter

Während des Nachbeobachtungszeitraumes kam es auch zu einer Verbesserung der echokardiographisch ermittelten LVEF in beiden Patientengruppen. In der Enterovirus-positiven Gruppe verbesserte sich die echokardiographisch bestimmte LVEF (n=24) in Ruhe hoch signifikant von 31% ± 11% auf 44% ± 10% (p=0,0000012). In der Enterovirus-negativen Gruppe kam es ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der LVEF (n=31) von 31% ± 10% auf 38% ± 13% (p=0,0012) (Abbildung 8). Der errechnete mittlere Unterschied zwischen den Ausgangs- und Follow-up-Werten der Enterovirus-positiven gegenüber den Enterovirus-negativen Patienten zeigte eine signifikante Verbesserung (p<0,0001) der LVEF zugunsten der Enterovirus-positiven Patienten (Abbildung 9).

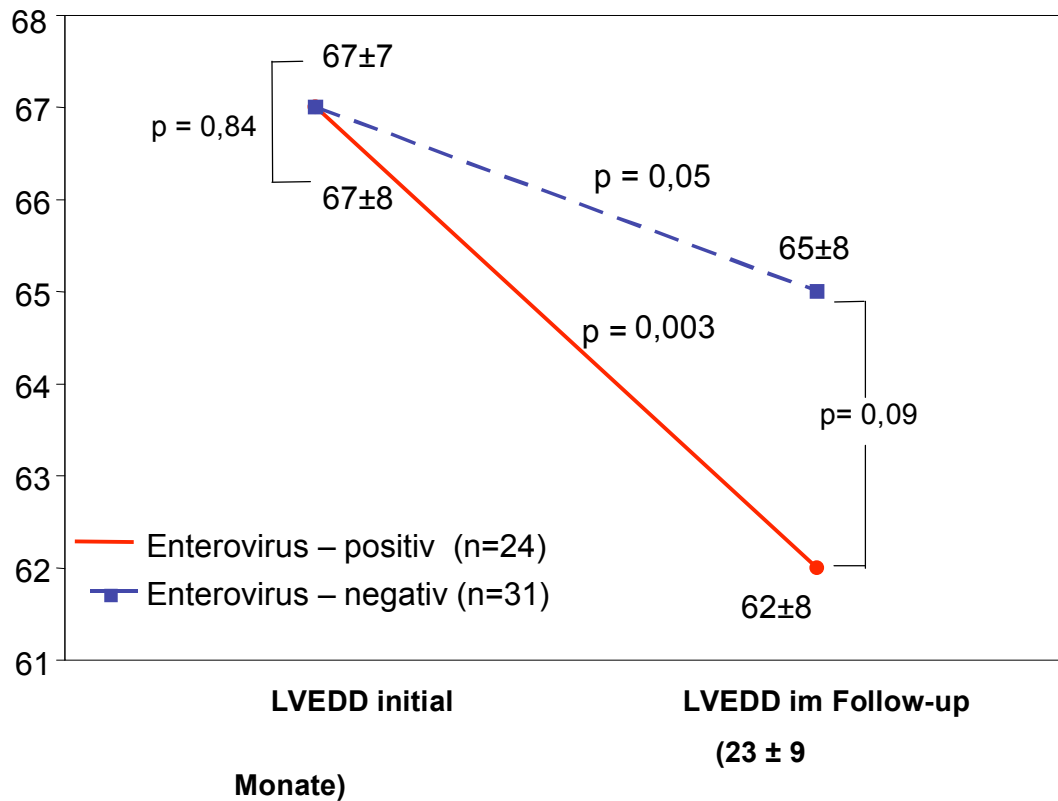
Abbildung 8:

Echokardiographisch ermittelter Verlauf der LVEF bei den Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Patienten mit DCM

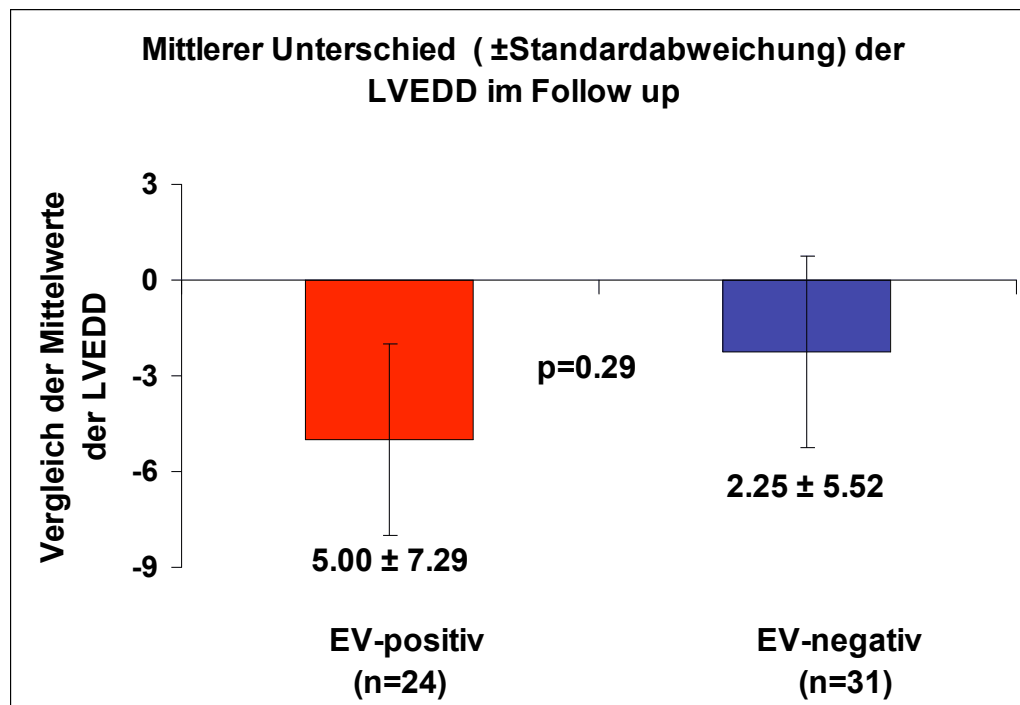
Abbildung 9:

Mittlerer Unterschied (±Standardabweichung) der LVEF zwischen Ausgangs- und Follow-up Werten der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Patienten mit DCM

Weiterhin konnte eine signifikante Verkleinerung des LVEDD in der Enterovirus-positiven Gruppe von 67mm ± 8mm auf 62mm ± 8mm ($p=0,003$) und in der Enterovirus-negativen Gruppe von 67mm ± 7mm auf 65mm ± 8mm ($p=0,05$) festgestellt werden (Abbildung 10), jedoch zeigte sich im Vergleich des mittleren Unterschiedes zwischen der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Gruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der Verbesserung (Abbildung 11).

Abbildung 10:**LVEDD [mm]**

Echokardiographisch ermittelter Verlauf des LVEDD bei den Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Patienten mit DCM

Abbildung 11

Mittlerer Unterschied (\pm Standardabweichung) der LVEDD zwischen Ausgangs- und Follow-up Werten der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Patienten mit DCM

4.7.4.2. Herzfrequenzvariabilität

Von den zu Beginn ausgewerteten 42 Patienten konnten im Verlauf die Daten der HRV von nur 26 Patienten erneut analysiert werden: sechs Patienten verstarben während des Beobachtungszeitraumes. Drei Langzeit-Elektrokardiogramme wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da diese während der ambulanten Kontrolle mit anderen Geräten erfolgten. Ein Patient konnte nicht nachverfolgt werden, da er unbekannt verzogen war und sechs weitere Langzeitelektrokardiogramme waren aus technischen Gründen nicht verwertbar, wobei eine erneute Kontrolle nicht stattfand.

In beiden Gruppen kam es zu einer signifikanten Zunahme des mittleren RR-Intervalls (RRI). Ebenfalls war in beiden Gruppen eine Zunahme des Wertes für SDNN während des Follow-up feststellbar. Die Unterschiede waren jedoch

weder in der Enterovirus-positiven noch in der Enterovirus-negativen Gruppe signifikant.

Der HRV – TI, ein artefaktbereinigter Parameter der Herzfrequenzvariabilität im Zeitbereich, zeigte in der Enterovirus-positiven Gruppe einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert. Demgegenüber war bei den Enterovirus-negativen Patienten kein signifikanter Unterschied im Verlauf des HRV – TI feststellbar. Jedoch unterschieden sich die Enterovirus-positiven und die Enterovirus-negativen Patienten nicht im Gruppenvergleich (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verlauf der Herzfrequenzvariabilität

Parameter	Enterovirus-positiv (n=9)	p-Wert (Gruppen-intern)	Enterovirus-negativ (n=17)	p-Wert (Gruppen-intern)	p-Wert (Gruppen-vergleich)
1. RRI [ms]	691 ± 104	0,03	710 ± 183	0,04	0,84
2. RRI [ms]	790 ± 77		815 ± 89		0,65
1. SDNN [ms]	106 ± 62	0,13	114 ± 47	0,12	0,72
2. SDNN [ms]	136 ± 28		132 ± 52		0,8
1. HRV-TI	38 ± 19	0,03	57 ± 28	0,19	0,08
2. HRV-TI	57 ± 17		68 ± 35		0,47

1.= Ausgangswert, 2. = Follow-up; RRI = mittleres RR-Intervall; HRV-TI = Triangel-Index; SDNN = Standardabweichung des mittleren RR-Intervalls

4.7.5. Invasiv gemessene Hämodynamik in Ruhe und unter Belastung

Eine erneute Einschwemmkatheteruntersuchung konnte bei 12 von anfänglich 24 untersuchten Patienten nach einem mittleren Zeitraum von 23 ± 9 Monaten durchgeführt werden.

Bei den vier Enterovirus-positiven Patienten, die mittels der Einschwemmkatheteruntersuchung untersucht wurden, fiel bei der Anfangsuntersuchung ein signifikant erhöhter pulmonal-kapillärer Verschlussdruck bei Belastung gegenüber den acht Enterovirus-negativen Patienten, die nachuntersucht wurden, auf ($p=0,01$). Dies war allerdings bei dem größeren Patientenkollektiv von anfänglich 11 Enterovirus-positiven Patienten nicht signifikant ($p=0,66$). Ansonsten waren weder bei den Enterovirus-positiven noch bei den Enterovirus-negativen Patienten signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Ausgangswerten feststellbar. Jedoch zeigte sich in der Enterovirus-positiven Gruppe tendenziell eine stärkere Abnahme des PAPm unter Belastung und des PCWPm in Ruhe und unter Belastung (Tabelle 8).

Tabelle 8: Hämodynamik in der Einschwemmkatheteruntersuchung

Parameter	Enterovirus-positiv (n=4)	p-Wert (Gruppen-intern)	Enterovirus-negativ (n=8)	p-Wert (Gruppen-intern)	p-Wert (Gruppen-vergleich)
1. PAPm Ruhe	17 ± 7	0,87	20 ± 4	0,15	0,43
2. PAPm Ruhe	18 ± 8		18 ± 3		0,9
1. PAPm Belastung	52 ± 11	0,5	46 ± 8	0,23	0,3
2. PAPm Belastung	44 ± 11		41 ± 11		0,66
1. PCWPm Ruhe	11 ± 8	0,62	11 ± 4	0,86	0,8
2. PCWPm Ruhe	8 ± 1		12 ± 5		0,21
1. PCWPm Belastung	38 ± 8	0,39	27 ± 5	0,94	0,01
2. PCWPm Belastung	32 ± 6		28 ± 11		0,54

1. = Ausgangswert, 2. = Follow-up, PCWPm = mittlerer pulmonal-kapillärer Verschlussdruck; PAPm = pulmonal-arterieller Mitteldruck

4.7.6. Medikamentöse Therapie

In der vorliegenden Untersuchung waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der medikamentösen Therapie zwischen den beiden untersuchten Gruppen, weder zu Beginn noch am Ende der Nachbeobachtungsphase, erkennbar. Bei der Verlaufskontrolle fand sich lediglich ein Trend zur vermehrten Gabe von ACE-Hemmern entsprechend den neuen Empfehlungen der Herzinsuffizienztherapie in beiden Gruppen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Medikamentöse Therapie im Follow-up

Parameter	EV - positiv (n=24)	EV - negativ (n=31)	p-Wert
1. ACE- Hemmer (%)	22/24 (92)	27/31 (87)	0,47
2. ACE- Hemmer (%)	24/24 (100)	30/31 (97)	0,56
1. Diuretika (%)	18/24 (75)	19/31 (75)	0,21
2. Diuretika (%)	19/24 (79)	25/31 (81)	0,68
1. Digitalis (%)	12/24 (50)	20/31 (65)	0,21
2. Digitalis (%)	16/24 (67)	23/31 (74)	0,38
1. β - Blocker (%)	16/24 (67)	26/31 (84)	0,12
2. β - Blocker (%)	17/24 (71)	23/31 (74)	0,72

1.= Ausgangswert; 2. = Follow-up Wert, ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme

5. Diskussion

5.1. Enterovirusnachweis

In der vorliegenden Untersuchung von 64 konsekutiven Patienten mit idiopathischer DCM konnten bei 41% (26/64) Enterovirusgenome in den endomyokardialen Biopsien nachwiesen werden. Damit lag die Prävalenz eher im oberen Bereich. Als Grund dafür können sicher die Heterogenität der untersuchten Patientengruppen, die demographischen Verhältnisse, das Krankheitsstadium und die unterschiedlich ausgewählten Primer und Bedingungen für die RT-PCR im Vergleich zu früheren Untersuchungen mit dieser Methode (Grumbach et al., 1999; Pauschinger et al., 1999; Krämmeler et al., 1994; Petitjean et al., 1992; Weiss et al., 1992; Jin et al., 1990) angenommen werden. Zusätzlich konnte die Empfindlichkeit der Enterovirus-spezifischen PCR durch die Verwendung frischer, sofort in flüssigem Stickstoff bei -80°C tiefgefrorener Myokardbiopsien, im Vergleich zu den in Formalin fixierten Myokardbiopsien anderer Studien (Figulla et al., 1995), erhöht werden. Durch die anschliessend erfolgte Southern-Blot-Hybridisierung des PCR-Produktes konnte noch zusätzlich eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden.

In der Arbeit von Figulla et al. (1995) konnte bei 26% (20/77) der Patienten mit einer DCM an in Formalin fixierten Myokardbiopsien mittels In-situ-Hybridisierung Enterovirus-RNA nachgewiesen werden. Why et al. (1994) führten den Nachweis der Enterovirusgenome an frischen, in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Myokardbiopsien ebenfalls mit Hilfe einer In-situ-Hybridisierung durch. Dabei zeigte sich bei 34% (41/129) der Patienten mit IDC das Vorhandensein von Enterovirus-RNA.

Die In-situ-Hybridisierung weist eine sehr hohe Sensitivität für die Erkennung von Enteroviren auf, da schon eine kleine Anzahl von 20 viralen Kopien ermittelt werden kann. Dennoch können Fehler bei der Entnahme und Verarbeitung der Endomyokardbiopsien zu einer zu geringeren Entdeckung der viralen Genome führen (Kandolf et al., 1998).

Wie Maisch et al. (2000) berichteten, ist die RT-PCR zur Entdeckung enteroviraler RNA an in Formalin gebetteten Myokardbiopsien weniger zuverlässig als die RT-PCR an in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Biopsien, da häufiger die Amplifizierung der Sequenzen der verarbeiteten mRNA des House Keeping Gens versagt und somit falsch-negative Resultate resultieren können.

Ein weiteres Problem bei der Diagnostik einer viralen Infektion des Herzens mittels Endomyokardbiopsie kann durch das Phänomen des so genannten „sampling error“ auftreten, da eine Virusinfektion des Myokards häufig fokal abläuft. Bei der Entnahme von zu wenigen Endomyokardbiopsien können möglicherweise die Virusgenome und der Entzündungsprozess nicht vollständig erfasst werden (Strauer, 1995; Why et al., 1994).

Why et al. (1994) waren der Ansicht, dass es zum Nachweis der Enteroviren unwichtig sei, ob die Endomyokardbiopsien aus dem rechten oder linken Ventrikel entnommen werden, da sie für beide Seiten identische positive Nachweise aufzeigen konnten, was auch in der vorliegenden Studie der Fall war. Bei den hier untersuchten Patienten wurden 6-8 rechts- oder linksventrikuläre Endomyokardbiopsien entnommen. In der Studie von Why et al. (1994) betrug die Zahl der entnommenen Myokardbiopsien ≥ 3 , in den Arbeiten von Figulla et al. (1995) und Pauschinger et al. (1999) ≥ 5 . Es ist daher anzunehmen, dass in den beiden grossen Vorstudien (Figulla et al., 1995; Why et al., 1994) mit der Entnahme von mehr Biopsien und der Verwendung der heute standardisierten, sensitiveren Nachweismethoden möglicherweise bei einem höheren Prozentsatz der Patienten enterovirale RNA hätte nachgewiesen werden können, was Figulla et al. (1995) bereits in ihrer Arbeit zur Diskussion stellten. Auch andere Autoren teilen die Ansicht, dass zum exakteren Nachweis enteroviraler Genome eine Entnahme mehrerer Biopsien nötig ist (Fujioka et al., 2000).

Pauschinger et al. (1999) wiesen mittels RT-PCR in Kombination mit Southern-Blot-Hybridisierung bei 40% (18/45) der Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion und dem klinischen Verdacht auf Myokarditis Enterovirus-Genome nach. Dabei gingen die Autoren noch weiter und unterschieden zwischen aktiver Replikation und latenter Persistenz der Enteroviren, die aus einem Genom mit singulärer RNA mit positiver Polarität bestehen, welches während der aktiven

viralen Replikation von einer Virus-encoding RNA-Polymerase in eine Minus-Strang RNA umgeschrieben wird (Hohenadl et al., 1991). Von diesen 18 Enterovirus-positiven Patienten waren bei 56% (10/18) Minus-Strang RNA, also eine aktive enterovirale Replikation, nachweisbar (Pauschinger et al., 1999).

Auch Fujioka et al. (2000) gelang der Nachweis von Coxsackievirus-Genomen in 35% (9/26) der in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Biopsien von Patienten mit DCM nach partieller Ventrikulektomie. Bei sieben der neun Patienten (78%) konnte Minus-Strang-RNA als Marker für eine aktive virale Replikation nachgewiesen werden. In einer neuen Studie von Fujioka et al. (2004) gelang bei 23% (7/30) amerikanischer und 32% (15/47) japanischer Patienten im Endstadium einer DCM der Nachweis enteroviraler RNA. Davon war bei 71% (5/7) der amerikanischen und 80% (12/15) der japanische Patienten Minus-Strang RNA nachweisbar.

5.2. Klinische Basisdaten

Bei den zu Beginn der Untersuchung erhobenen rein klinischen Parametern waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar, so dass kein klinisches Merkmal auf eine höhere Prävalenz infektiöser Enterovirus-RNA schließen ließ, wie das auch bereits bei anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Pauschinger et al., 1999; Figulla et al., 1995; Why et al., 1994).

Das Durchschnittsalter der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit DCM lag mit 51 ± 11 Jahren über dem statistischen Hauptmanifestationsalter von 30-45 Jahren (Maisch et al., 2002).

Die Dauer der Symptome war für beide Gruppen vergleichbar. In der Untersuchung von Why et al. (1994) zeigte jedoch die Enterovirus-positive Gruppe eine signifikant kürzere Anamnesedauer, was als aggressiveres Verhalten der Enteroviren im Myokard gewertet wurde.

Außer dem Vorhandensein von Vorhofflimmern konnten keine hämodynamischen Merkmale festgestellt werden, die auf eine höhere Prävalenz enteroviraler RNA im Herzmuskel schliessen ließen. Das Auftreten von

Vorhofflimmern war in der Enterovirus-positiven Gruppe signifikant erhöht ($p=0,04$), was auch Figulla et al. (1995) beobachten konnten. Wodurch ein vermehrtes Auftreten von Vorhofflimmern bei den Enterovirus-positiven Patienten verursacht wird bleibt jedoch unklar.

In der Enterovirus-negativen Gruppe wurde signifikant häufiger über eine regelmäßige Alkoholaufnahme von $<50\text{g/d}$ in 42% der Fälle berichtet ($p=0,02$), während die Enterovirus-positive Gruppe häufiger angab, nur gelegentlich, z.B. bei Familienfeiern, alkoholische Getränke zu konsumieren. In den Untersuchungen von Figulla et al. (1995) und Why et al. (1994) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alkoholkonsums während der Erhebung der Basisdaten und des Follow-up zwischen beiden Gruppen. Von einigen Autoren (Schoppet et al., 2001; Maisch et al., 1998) wird diskutiert, dass regelmäßiger übermäßiger Alkoholkonsum zu einer alkoholinduzierten Kardiomyopathie (Richardson et al., 1996) führen kann, allerdings ist unbekannt, welche Mengen und Dauer dafür erforderlich sind.

5.3. Klinischer Verlauf

5.3.1. Mortalität

Die Mortalität während des Beobachtungszeitraumes von $23 \pm 9,1$ Monaten betrug in der Enterovirus-positiven Gruppe 8% (2/26), in der Enterovirus-negativen Gruppe 16% (6/37), was sich in der Kaplan-Meier-Analyse als nicht signifikant erwies.

Von den verstorbenen Patienten aus der Enterovirus-negativen Gruppe befanden sich zur Zeit der Diagnosestellung zwei in der NYHA-Klasse II, drei in der NYHA-Klasse III und einer in der NYHA-Klasse IV. Die zwei verstorbenen Patienten aus der Enterovirus-positiven Gruppe waren beide in der NYHA-Klasse III.

In der Studie von Figulla et al. (1995) zeigte sich ebenfalls ein ähnlicher klinischer Verlauf während der Nachbeobachtungszeit von etwa 2 ½ Jahren. Aus

der Enterovirus-negativen Gruppe verstarben 19% (11/57) der Patienten, 7% (4/57) erhielten eine Herztransplantation. In der Enterovirus-positiven Gruppe verstarb ein Patient 5% (1/20) an chronischem Herzversagen. Bei keinem war eine Herztransplantation notwendig, somit war die transplantationsfreie Zeit bei der Enterovirus-positiven Gruppe signifikant länger ($p < 0,05$).

Zu anderen Ergebnissen kamen Why et al. (1994), in deren Untersuchung mit ähnlicher Nachbeobachtungszeit signifikant mehr Patienten mit nachgewiesener Enterovirus-RNA verstorben waren ($p = 0,02$). Bei einer erneuten Myokardbiopsie waren bei vier von sechs der noch lebenden Patienten aus der Enterovirus-positiven Gruppe keine Enterovirus-Genome mehr nachweisbar. Drei dieser vier Patienten zeigten eine deutliche Besserung der hämodynamischen Werte. Die beiden Patienten mit weiterhin positivem Nachweis von enteroviraler RNA verstarben im weiteren Verlauf. Deshalb kamen die Autoren zu dem Schluss, dass der Nachweis von Enterovirus-Genomen als ein ungünstiger prädiktiver Parameter bei der DCM einzustufen sei.

Nach neueren Untersuchungen (Pauschinger et al., 2004; Fujioka et al., 2000; Pauschinger et al., 1999) ist eine weitere Differenzierung bezüglich der prognostischen Bedeutung myokardialer Enterovirus-Genome möglich, bei denen zwischen aktiver Replikation und bloßer Persistenz der Enteroviren im Myokard unterschieden wird.

Pauschinger et al. (1999) kamen zu dem Schluss, dass der differierende Krankheitsverlauf der Enterovirus-positiven Patienten mit DCM durch die verschiedenen biologischen Aktivitäten der Enteroviren, die zu unterschiedlicher Schädigung des Myokards führen können, begründet werden könnte.

Dies könnte eine mögliche Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse in der Untersuchung von Figulla et al. (1995) und der vorliegenden Studie auf der einen und der Arbeit von Why et al. (1994) auf der anderen Seite sein.

In einer weiteren Studie von Fujioka et al. (2000) wurden 26 Patienten mit DCM eingeschlossen, die allerdings wesentlich schlechtere hämodynamische Ausgangswerte als die hier untersuchte Studienpopulation hatten. 63% (17/26) der Patienten überlebten den Nachbeobachtungszeitraum von einem Jahr mit

meist verbesserten hämodynamischen Werten. Während des Follow-up verstarben innerhalb der ersten sechs Monate sechs der sieben Patienten, bei denen eine aktive Replikation in den Myokardbiopsien nach partieller Ventrikulektomie nachgewiesen worden war, an Herzinsuffizienz. Somit war die Mortalität signifikant höher bei den Enterovirus-positiven gegenüber den Enterovirus-negativen Patienten, wobei diejenigen Enterovirus-positiven Patienten eine erhöhte Mortalitätsrate zeigten, bei denen Minus-Strang-RNA im Myokard gefunden werden konnte. Fujioka et al. (2000) kamen daher zu dem Ergebnis, dass im Endstadium der DCM bei einem hohen Prozentsatz der Patienten eine aktive Replikation der Enteroviren im Myokard stattfindet und als prognostisch schlechtes Zeichen zu werten sei. Seine Theorie wird durch Tiermodelle der Coxsackievirus – assoziierten Myokarditis (Andreoletti et al., 1997) unterstützt. Wie allerdings heute bekannt ist, scheint die partielle Ventrikulektomie nicht die adäquate Therapie für das Endstadium der Herzinsuffizienz zu sein, da sich bei den Langzeituntersuchungen eine schlechte Überlebensrate zeigte (Bestetti, 2004). Insofern stellt sich die Frage, ob die erhöhte Mortalität in seiner Untersuchung allein durch einen positiven Enterovirusnachweis bzw. die aktive Replikation erklärt werden kann, oder ob nicht auch andere Ursachen, wie beispielsweise der postoperative Verlauf oder ausgeprägtere Vorschäden des Myokards eine entscheidende Rolle gespielt haben könnten, auch wenn sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der präoperativen hämodynamischen Werte oder postoperativen Resultate zwischen beiden Gruppen zeigten.

Die biologische Aktivität von Enteroviren und somit auch anderer Viren im Myokard stellt mit Sicherheit einen interessanten Diskussionspunkt zur Ätiologie der DCM dar. In dieser Untersuchung wurde nicht zwischen Plus-Strang und Minus-Strang RNA unterschieden, da zum Zeitpunkt des Studienbeginns die technischen Möglichkeiten noch nicht existierten. Aber hat die Persistenz der Enteroviren wirklich eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung eines Myokardschadens und somit auf die Entwicklung einer DCM? Möglicherweise sind die Enteroviren nach der initialen Infektion des Myokards im Stadium der chronischen Herzmuskelerkrankung, der DCM, noch nachweisbar und zeigen eine aktive Replikation auf unterschiedlichem Niveau mit verschiedenen

ausgeprägter Myokardschädigung oder lediglich die oben erwähnte Persistenz und sind daher kaum noch oder nicht mehr myokardschädigend. So könnte die signifikante klinische und hämodynamische Verbesserung der Enterovirus-positiven Patienten durch eine überwiegend bloße Viruspersistenz ohne Replikationsaktivität bei diesen Patienten erklärt werden. Dagegen stellt sich die Frage nach dem Vorliegen einer aktiven Replikation der Enteroviren bei den Patienten, bei denen keine Verbesserung eingetreten ist.

Als weitere mögliche Erklärung für den günstigen Verlauf der DCM bei den Enterovirus-positiven Patienten kann auch eine spontane Elimination oder Reduktion der Viruslast bei einer gleichzeitig ablaufenden Entzündungsreaktion zumindest bei einigen Patienten nicht ausgeschlossen werden, wie dies Why et al. (1994) beschrieben. Dafür spricht laut Figulla et al. (1995) auch das vermehrte Auftreten von Makrophagen bei den Enterovirus-positiven Patienten, was bei den hier untersuchten Enterovirus-positiven Patienten nicht zu beobachten war. Letztlich könnte aber der Beweis der Viruselimination nur durch eine zweite Endomyokardbiopsie geklärt werden, die jedoch in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt wurde. Wie bereits erwähnt, zeigten in der Untersuchung von Why et al. (1994) die Patienten mit nicht mehr nachweisbarer enteroviraler RNA einen besseren Verlauf, was wiederum mit den aktuellen Ergebnissen zumindest partiell übereinstimmen würde.

5.3.2. Die NYHA-Klassifikation

Die NYHA-Klassifikation zur klinischen Einschätzung des Grades der symptomatischen Herzinsuffizienz, ein bekannter Parameter für den prognostischen Verlauf der Erkrankung, war zu Beginn der Untersuchung in beiden Gruppen vergleichbar. Anders als in der Arbeit von Why et al. (1994) waren nur ein Patient (4%) aus der Enterovirus-positiven Gruppe und drei Patienten (8%) aus der Enterovirus-negativen Gruppe in der NYHA-Klasse IV, die Mehrzahl (56%) der untersuchten Patienten gaben einen NYHA-Grad III (36/64 Patienten) an. Somit waren die Symptome der Herzinsuffizienz in der hier untersuchten Studienpopulation nicht so stark ausgeprägt wie bei Why et al.

(1994), die bei 49/120 (41%) Patienten die NYHA-Klasse III und bei 40/120 (33%) Patienten die NYHA-Klasse IV zum Zeitpunkt der Herzkatheteruntersuchung festgestellt hatten. Bei 15/16 (94%) der verstorbenen oder transplantierten Patienten war als Ausgangswert eine NYHA-Klasse III oder IV diagnostiziert worden. Why et al. (1994) definierten daher das symptomatische Herzversagen zum Zeitpunkt der Herzkatheteruntersuchung als eine unabhängige Variable mit prädiktivem Wert für das Überleben.

In der Arbeit von Figulla et al. (1995) fanden sich ebenfalls ähnlich schlechte Ausgangswerte. Von den Enterovirus-positiven Patienten gaben 1/20 (5%) die NYHA-Klasse IV und 6/20 (30%) die NYHA-Klasse III an. In der Gruppe der Enterovirus-negativen Patienten gab es 1/57 (2%) Patienten mit der NYHA-Klasse IV und 17/57 (30%) Patienten mit der NYHA-Klasse III. Im Verlauf zeigte sich bei 11/20 (55%) der Enterovirus-positiven Patienten, aber nur bei 10/57 (18%) der Enterovirus-negativen Patienten eine hämodynamische Verbesserung. Bei 40% der Patienten, bei denen keine enterovirale RNA nachgewiesen werden konnte, waren gleich bleibende Werte und bei 11% eine Verschlechterung der Symptomatik während des Follow-up beobachtet worden.

Im Gegensatz dazu kam es in der vorliegenden Untersuchung während des Nachbeobachtungszeitraumes in der Enterovirus-positiven Gruppe bei 17/24 (71%) zu einer Verbesserung der NYHA-Klasse und bei 7/24 (29%) zeigten sich ein unveränderter klinischer Grad der Herzinsuffizienz. Bei keinem Patienten aus der Enterovirus-positiven Gruppe wurde eine Verschlechterung festgestellt. Dagegen zeigten 17/31 (55%) der Patienten aus der Enterovirus-negativen Gruppe eine klinische Verbesserung der Herzinsuffizienz, 9/31 (29%) unveränderte Befunde und 5/31 (16%) sogar eine Verschlechterung der Herzinsuffizienzsymptomatik bei vergleichbarer Therapie der beiden Gruppen. Insgesamt kam es in beiden Gruppen zu einer Verbesserung der NYHA-Klasse während des Nachbeobachtungszeitraums, wobei sich die Enterovirus-positive Gruppe gegenüber der Enterovirus-negativen Gruppe im mittleren Unterschied hochsignifikant verbesserte ($p < 0,0001$).

5.4. Histomorphometrie und Immunhistologie

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich in den entnommenen Myokardbiopsien bezüglich der Histomorphometrie, d.h. des mittleren Myozytendurchmessers und des mittleren Fibroseanteils, keine Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen.

Bisher ist weiterhin unklar, in welchem Ausmaß die myokardiale Persistenz von Enteroviren eine Konversion der Myokarditis zur Kardiomyopathie verursacht und welche Bedingungen diese Konversion begünstigen (Caforio et al., 1997; Heim et al., 1994). Da, wie bereits erwähnt, die Myokarditis oft fokal abläuft und die entzündlichen Foci somit bei Standardendomyokardbiopsien verpasst werden können, ist es bisweilen schwierig, die entzündlichen Infiltrate zu erfassen und mittels konventioneller histologischer Techniken zwischen Nicht-Entzündungszellen (Fibroblasten, Perizyten) und infiltrierenden Lymphozyten zu unterscheiden (Billingham, 1989). Deshalb wurden zusätzlich immunhistologische Techniken verwendet, um die Lymphozyteninfiltrate identifizieren zu können (Kühl et al. 1996). Dabei war bei der vorliegenden Untersuchung ein Trend zu einer eher geringen Expression von MHC-Antigenen der Klasse I und II erkennbar. Allerdings gab es auch hier keinen Unterschied zwischen der Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Gruppe, so dass man anhand immunhistologischer Kriterien nicht auf das Vorhandensein von enteroviraler RNA schliessen konnte. Insgesamt entsprachen alle Patienten histologisch und immunhistologisch dem Bild einer DCM.

In der Arbeit von Figulla et al. (1995) war bei den Patienten mit DCM in der Enterovirus-negativen Gruppe eine vermehrte strukturelle Zerstörung ($p=0,036$) in Form einer Reduktion des Myofibrillenvolumens innerhalb der Myozyten nachweisbar. Andere histomorphometrische Unterschiede waren nicht festzustellen. Bei der immunhistologischen Untersuchung war ein Trend zu mehr Makrophagen und T-Lymphozyten in den Enterovirus-positiven Endomyokardbiopsien erkennbar. Auch die Ergebnisse von Why et al. (1994) zeigten eine Tendenz zum vermehrten Nachweis von entzündlichen Infiltraten in der Enterovirus-positiven Gruppe, was allerdings statistisch nicht signifikant war.

In einer Studie von Pauschinger et al. (1999) konnten in 87% der Endomyokardbiopsien, in denen eine Myokarditis entsprechend der Dallas-Klassifikation ausgeschlossen war, vermehrt Entzündungszellinfiltrate (CD3) nachgewiesen werden. Jedoch erlaubten auch diese immunhistologischen Ergebnisse keine Unterscheidung zwischen Patienten mit und denjenigen ohne aktive virale Replikation.

Dagegen konnten Deguchi et al. (2001) bei Patienten mit DCM und positivem Nachweis aktiver Virusreplikation Myokardläsionen, besonders im Bereich des Endokards, nachweisen. Diese als enterovirale Signale bezeichneten Läsionen wurden in degenerierten Myokardzellen, interstitiellen Entzündungszellen und endothelialen Zellen der kleinen Gefäße gefunden und waren bei den Enterovirus-negativen Patienten nicht nachweisbar. Daher schlussfolgerten die Autoren, dass die aktive virale Replikation eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Myokardläsionen bei Patienten mit DCM zu spielen scheint und als ein prognostischer Faktor zu bewerten sei.

Insgesamt scheint aber eine histologische und immunhistologische Differenzierung bezüglich der Anwesenheit von viralen Genomen nicht möglich.

Der Prozess der Apoptose ist ein weiterer interessanter Ansatzpunkt, der seit neuerer Zeit im Zusammenhang mit der Pathogenese der Kardiomyopathien diskutiert wird. Die Apoptose ist definiert als aktiver, energieverbrauchender Vorgang des Zelltodes und tritt bei verschiedenen kardialen Erkrankungen in unterschiedlichen Qualitäten und Quantitäten auf (Alter et al., 2001). Sie wird für den Verlust kontraktile Kardiomyozyten bei entzündlichen Herzmuskerkrankungen mitverantwortlich gemacht (Alter und Maisch, 2004; Olivetti et al., 1997; Narula et al., 1996).

In der Studie von Alter et al. (2001) wurde die höchste Apoptoserate der Kardiomyozyten bei aktiver viraler Myokarditis festgestellt. Auch bei nachgewiesener lediglicher Persistenz von Cytomegalie- und Adenovirusgenomen, sowie bei Enterovirus-negativer DCM zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate. Dagegen war erstaunlicherweise bei der Borderline-Myokarditis mit nachgewiesenen Enterovirus-Genomen keine Apoptose feststellbar. Daher kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Apoptose zum Zelltod bei aktiver Myokarditis beiträgt und möglicherweise auch eine nicht zu

vernachlässigende Rolle bei der Entstehung der DCM spielt. Dagegen scheinen die Enteroviren einen antiapoptotischen Effekt zu haben, da bei ihrer Anwesenheit keine Apoptose im Myokard nachweisbar war. Ähnliche antiapoptotische Prozesse wurden auch bei anderen RNA-Viren, wie den Polioviren und Enzephalomyocarditisviren, beobachtet (Schwarz et al., 1998; Tolskaya et al., 1995).

Anhand des klinischen Verlaufes der DCM bei Enterovirus-positiven Patienten kam eine Studie von Lotze et al. (2001) zu entsprechenden Ergebnissen. Die Autoren untersuchten in einer prospektiven Arbeit 31 Patienten mit DCM und konnten bei 45% (14/31) enterovirale RNA im Myokard nachweisen. Bei den Enterovirus-positiven Patienten war der Index der geschädigten Myozyten aufgrund apoptotischer Prozesse signifikant kleiner. Auch die Ejektionsfraktion und die NYHA-Klasse verbesserten sich während des Follow-up von etwa 16 Monaten signifikant gegenüber den Enterovirus-negativen Patienten. Daraus wurde von den Autoren der Schluss gezogen, dass bei Enterovirus-positiven Patienten mit DCM weniger Myozytenschäden durch apoptotische Prozesse auftreten und daraus langfristig ein besserer klinischer und hämodynamischer Verlauf resultiert.

5.5. Nicht-invasive Diagnostik

5.5.1. Hämodynamische Parameter in der transthorakalen Echokardiographie

Sowohl für die Enterovirus-positive als auch für die Enterovirus-negative Patientengruppe wurden vergleichbare Anfangsdaten bezüglich der Hämodynamik erhoben. Während des Nachbeobachtungszeitraumes kam es zu einer signifikanten Steigerung der echokardiographisch ermittelten LVEF und einer signifikanten Abnahme des LVEDD in beiden Gruppen, was deutlich mit einer Verbesserung der NYHA-Klassen einherging. Es zeigte sich jedoch auch hier eine Signifikanz zugunsten der Enterovirus-positiven Patienten.

Diese Beobachtung war auch in der Arbeit von Figulla et al. (1995) für die Enterovirus-positiven Patienten beschrieben worden. Allerdings zeigte sich im

Gegensatz zu seiner Studie im vorliegenden Patientenkollektiv ebenfalls eine subjektive Verbesserung der klinischen Symptomatik bei den Enterovirus-negativen Patienten.

Eine mögliche Rolle für die klinische und hämodynamische Verbesserung der Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Patienten könnte u.a. die vergleichbare, weniger stark ausgeprägte Herzinsuffizienz zu Beginn dieser Untersuchung in beiden Gruppen sein, wie sie bei den beiden Vorstudien beschrieben und als unabhängige Variable postuliert worden war (Figulla et al., 1995; Why et al., 1994).

Maisch et al. (2002) stellten den Grundsatz auf: „Je jünger der Patient, desto ungünstiger ist die weitere Lebenserwartung. Je eingeschränkter die Ejektionsfraktion, desto ungünstiger die Prognose.“ Mit 51 ± 11 Jahren lag das durchschnittliche Alter der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten über dem statistischen Hauptmanifestationsalter der IDC. Die mittlere Ejektionsfraktion lag bei den Enterovirus-positiven Patienten bei 30 ± 10 % und bei den Enterovirus-negativen Patienten bei 39 ± 9 % und war somit zwar mittelgradig erniedrigt, aber noch im „tolerablen“ Bereich, weshalb man auch von vergleichsweise „besseren Ausgangswerten“ im Vergleich zu anderen bisherigen Studien (Pauschinger et al., 1999; Figulla et al., 1995; Why et al., 1994) sprechen kann. Zum anderen ist bei etwa einem Drittel der Patienten im ersten Jahr eine Spontanheilungsrate zu bedenken, die sich durch körperliche Schonung positiv beeinflussen lässt (Kühl et al., 1997). Weiterhin wurden beide Gruppen vergleichbar medikamentös nach den aktuellen Richtlinien der Herzinsuffizienztherapie (Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology, 2001) behandelt und auf eine Therapie mit β -Blockern eingestellt, was sicherlich einen stark positiven Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung sowohl der Enterovirus-positiven, als auch der Enterovirus-negativen Patienten mit DCM hatte.

5.5.2. Herzfrequenzvariabilität im Langzeitelektrokardiogramm

Die Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HRV) bietet bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Ätiologie einen Ansatzpunkt zur Abschätzung des individuellen Arrhythmierisikos, da bei diesen Patienten signifikant niedrigere Werte in den Zeitbereichsparametern als Ausdruck der sympathikovagalen Imbalance auftreten (Fei et al., 1994; Kleiger et al., 1987). Diese Beobachtung konnte auch für Patienten mit DCM bestätigt werden (Ajiki et al., 1993; Mbaissouroum et al., 1993). Insbesondere die Standardabweichung der Länge aller RR-Intervalle (SDNN) gilt als geeigneter Faktor, eine Hochrisikogruppe zu erkennen (Stein et al., 2000; Przibille et al., 1998).

Kleiger et al. (1987) zeigten erstmals, dass eine Reduktion der Zeitbereichsparameter mit einer signifikant höheren Mortalität einhergeht. Patienten nach akutem Myokardinfarkt mit einer $SDNN < 50 \text{ msec}$ hatten ein 3,4faches Mortalitätsrisiko. Auch andere Autoren (Przibille et al., 1998) kamen zu dem Ergebnis, dass eine reduzierte HRV ($SDNN < 50 \text{ ms}$) bei Patienten mit DCM auf eine gesteigerte Gefährdung durch den plötzlichen Herztod, wie auch auf eine erhöhte Mortalität durch ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, hinweist.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Yi et al. (1997), die 64 Patienten mit DCM untersuchten und ebenfalls eine signifikante Reduktion der HRV feststellten. Bei allen Patienten korrelierte die erniedrigte Herzfrequenzvariabilität mit der NYHA-Klasse, der linksventrikulären Dilatation und der erniedrigten LVEF. Patienten mit DCM und einer $SDNN < 50 \text{ ms}$ hatten eine signifikant kürzere Überlebensdauer. Die Arbeiten von Yi et al. (1997) und anderen Autoren (Karcz et al., 2002; Przibille et al., 1998;) definierten daher die $SDNN < 50 \text{ ms}$ als einen unabhängigen, nicht invasiven Marker zur frühen Erkennung der Patienten, die ein erhöhtes Risiko haben, eine progrediente Herzinsuffizienz im Rahmen der DCM zu entwickeln.

Zu Beginn der vorliegenden Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Herzfrequenzvariabilität und des so genannten Triangel-Index. Auch die Standardabweichung der RR-Intervalle der Enterovirus-positiven Gruppe war mit derjenigen der Enterovirus-negativen Gruppe vergleichbar ($102 \pm 59 \text{ ms}$; $n=10$ vs. $116 \pm 43 \text{ ms}$; $n=22$; $p=0,47$).

Während des Follow-up kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Verbesserung der mittleren RR-Intervalle und einer tendenziellen Steigerung der SDNN, die allerdings in keiner der beiden Gruppen signifikant war. Zusätzlich verbesserte sich der Triangel-Index signifikant in der Enterovirus-positiven Gruppe.

In der vorliegenden Untersuchung wurden nur die Daten von einem der acht verstorbenen Patienten in die Langzeitauswertung aufgenommen, da bei zwei Patienten ein Vorhofflimmern vorlag und die restlichen Patienten während des Follow-up verstarben. Bei keinem der acht verstorbenen Patienten war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Reduktion der SDNN < 50 ms beobachtet worden. Somit gab es keinerlei Hinweis auf ein erhöhtes Risiko für ein kardiales Ereignis bei diesen Patienten.

5.6. Invasiv gemessene hämodynamische Parameter

Bei der zu Beginn durchgeführten Rechtsherzkatheteruntersuchung im Rahmen der invasiven Diagnostik zum Einschluss der Patienten in diese Untersuchung unterschied sich die Enterovirus-positive nicht von der Enterovirus-negativen Gruppe bezüglich der hämodynamischen Parameter. Die gemessenen Werte stimmten mit dem klinischen Bild und den echokardiographisch bestimmten Parametern einer Herzinsuffizienz überein. Eine erneute Rechtsherzkatheteruntersuchung wurde nicht durchgeführt, so dass keine Verlaufswerte erhoben werden konnten.

Bei der Einschwemmkatheteruntersuchung zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes (PAPm) und des mittleren pulmonal-kapillären Verschlussdruckes (PCWPm) in Ruhe und unter Belastung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Autoren der beiden großen Vorstudien (Figulla et al., 1995; Why et al., 1994). In unserem Follow-up konnten lediglich vier Enterovirus-positive und acht Enterovirus-negative Patienten mit dem Einschwemmkatheter nachuntersucht werden. Es zeigte sich bei den

Enterovirus-positiven Patienten eine Tendenz zur Abnahme des PAPm unter Belastung, sowie des PCWpm in Ruhe und unter Belastung. Jedoch ist bei diesem sehr kleinen nachkontrollierten Patientenkollektiv die Aussagefähigkeit als eher gering einzuschätzen.

5.7. Therapie der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie

In Anlehnung an das neurohumorale Konzept der Herzinsuffizienz zeigten klinische Studien mit Pharmaka (Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren bzw. als Alternative AT-1-Rezeptor-Antagonisten, β -Rezeptoren-Blocker und Aldosteronantagonisten wie Spironolacton und Eplerenon), die in die neurohumorale Regulation eingreifen, eine Prognoseverbesserung von Patienten mit Herzinsuffizienz (Di Lenarda et al., 2004; Fowler, 2004; Pitt et al., 2003; Poole-Wilson et al., 2003; Leizorovicz et al., 2002 [CIBIS and CIBIS II]; Hoppe und Erdmann, 2001; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology, 2001; Erdmann, 2000; Hjalmarson and Fagerberg, 2000; Pitt et al., 1999;).

Bei den hier untersuchten Patientengruppen mit Enterovirus-positiver und Enterovirus-negativer DCM zeigten sich zu Beginn keine Unterschiede bezüglich der medikamentösen Therapie mit ACE-Hemmern, β -Rezeptoren-Blockern, Diuretika und Digitalis. Auch im Verlauf differierten die beiden Gruppen in der medikamentösen Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz nicht voneinander, wobei ein Trend zur vermehrten Gabe von Angiotensin-Conversionsenzym-Inhibitoren, entsprechend der Empfehlungen zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology, 2001) in beiden Gruppen auffiel.

In der Untersuchung von Figulla et al. (1995) wurden vier Enterovirus-positive Patienten mit einer zunehmenden hämodynamischen Verschlechterung über einen Zeitraum von sechs Monaten mit Interferon- α therapiert, woraufhin sich eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei drei Patienten

zeigte. Bei dem vierten Patienten waren die Werte gleich bleibend. Bei allen vier Patienten kam es aber zu einer deutlichen Reduktion des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes und zur Verbesserung der NYHA-Klasse um eine Stufe.

Noutsias et al. (2003) beobachteten, dass bei Patienten mit DCM und Persistenz von Enteroviren oder Adenoviren eine Therapie mit Interferon- α in Anlehnung an die Virushepatitis zur viralen Elimination und zu einem Abklingen der intramyokardialen Entzündung führen kann. Gleichzeitig zeigte sich in der Arbeit von Noutsias et al. (2003) eine signifikante Verbesserung der systolischen linksventrikulären Funktion sowie der Herzinsuffizienzsymptomatik.

Von verschiedenen Autoren wurde daher in den vergangenen Jahren immer wieder diskutiert, dass bei Patienten mit DCM und dem Nachweis von Enterovirus-Genomen im Myokard die Gabe von Interferon- α als therapeutische Option im Fall einer hämodynamischen Verschlechterung angesehen werden kann (Kühl et al., 2003; Noutsias et al., 2002; Hufnagel et al., 2000; Heim et al., 1994). In den letzten Jahren wurden zwei große randomisierte prospektive multizentrische Studien zu diesem Thema initiiert [ESETCID (European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Disease; Hufnagel et al., 2000); BICC (Betaferon® In Chronic Viral Cardiomyopathy; Kuhl et al., 2003)], allerdings sind die endgültigen Resultate zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehend.

Als weitere Therapieoption wird die immunsuppressive Behandlung von Patienten bei progressiver Herzinsuffizienz ohne Virusnachweis im Myokard und persistierender Entzündungsreaktion diskutiert. Ziel dieser therapeutischen Intervention ist die Unterbrechung einer gestörten Selbst-/Fremderkennung und der daraus resultierenden, immunologisch gesteuerten Selbstdestruktion (Wojnicz et al., 2001). Bisher konnte nur in einer randomisierten Studie von Wojnicz et al. (2001) gezeigt werden, dass eine immunsuppressive Therapie zu einer hämodynamischen Langzeit-Verbesserung bei Patienten mit DCM führt, indes weisen auch weitere kleinere Studien in diese Richtung (Kühl et al., 1997; Vester et al., 1997). Zu einer gegensätzlichen Meinung kamen die Autoren des „American Myocarditis Treatment Trial“ (Hahn et al., 1995; Mason et al., 1995), die allerdings die Patienten nach rein histologischen Kriterien beurteilten und

weder den Spontanverlauf noch eine mögliche Viruspersistenz bei der Myokarditis berücksichtigten.

Als weiteres etabliertes Therapiekonzept hat sich bei Patienten mit Herzinsuffizienz im klinischen Stadium NYHA III und IV und intraventrikulären Leitungsstörungen, die biventrikuläre Stimulation (Resynchronisationstherapie), meist kombiniert mit einem implantierbaren Kardioverter-Defibrillator (ICD), entwickelt. Die bisher vorliegenden Daten sind sehr viel versprechend, da eine signifikant erniedrigte Mortalitätsrate bei Patienten mit fortgeschrittener chronischer Herzinsuffizienz, die mittels dieser Kombination therapiert wurden, nachgewiesen werden konnten. (Abraham et al., 2004 ; Bristow et al., 2004, Cazeau et al., 2004; Linde et al., 2003).

Während des Follow-up wurden bei keinem Patienten eine Interferon- α oder Immunsuppressionstherapie durchgeführt, da diese beiden Behandlungsformen nach wie vor als experimentelle Therapiekonzepte gelten und eine solche Therapieoption nicht im Studienprotokoll vorgesehen war. Ebenso erhielt kein Patient aus dem untersuchten Studienkollektiv einen biventrikulären Schrittmacher, da dieses Therapieverfahren zum Zeitpunkt der Studie noch nicht als allgemein anerkannte Methode zur Behandlung der chronischen therapierefraktären Herzinsuffizienz bei der idiopathischen DCM, im Gegensatz zum heutigen Zeitpunkt, galt.

6. Schlussfolgerung

Auf Grund der stärker ausgeprägten klinischen und hämodynamischen Verbesserung der Patienten mit Enterovirus-positiver DCM im Vergleich zu den Patienten mit Enterovirus-negativer DCM lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich bei der idiopathischen DCM mit Nachweis enteroviraler Genome im Myokard um eine Krankheitsentität mit günstiger Prognose handelt. Daher scheint der Nachweis enteroviraler RNA von prädiktivem Wert für den Krankheitsverlauf bei der DCM zu sein.

Ob es bei den sich klinisch verbesserten Enterovirus-positiven Patienten während der Nachbeobachtungszeit zur Viruselimination kam oder ob ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf der Patienten mit idiopathischer DCM und der Replikationsaktivität der Enteroviren bestand, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht beantworten und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

1. Abraham WT, Young JB; Leon AR; Adler S, Bank AJ, Hall SA, Liebermann R, Liem LB, O'Connell JB, Schroeder JS, Wheelan KR and Multicenter InSync ICD II Study Group (2004) Effects of cardiac resynchronization on disease progression in patients with left ventricular systolic dysfunction, an indication for an implantable cardioverter-defibrillator, and mildly symptomatic chronic heart failure. *Circulation* 110:2864-8.
2. Ajiki K, Murakawa Y, Yanagisawa-Miwa A, Usui M, Yamashita T, Oikawa N and Inoue H (1993) Autonomic nervous system activity in idiopathic dilated cardiomyopathy and in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 71:1316-20.
3. Algra A, Tijssen J, Roelandt J, Pool J and Lubsen J (1993) Heart rate variability from 24 hour electrocardiography and the 2-year risk for sudden death. *Circulation* 88:180-185.
4. Alter P and Maisch B (2004) Escape from cardiomyocyte apoptosis by enterovirus persistence due to elevated soluble Fas-receptors. *Z Kardiol* 93:524-532.
5. Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S and Maisch B (2001) Apoptosis in Myocarditis and dilated cardiomyopathy: does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? An endomyocardial biopsie study. *Cardiovasc Pathol* 10:229-34.
6. Andreoletti L, Hober D, Bequart P, Belaich S, Copin MC, Lambert V and Wettre P (1997) Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships between virus replication and myokardial damage in persistent cardiac infection. *J Med Virol* 52:206-14.
7. Arbustini E, Grasso M, Porcu E, Bellini O, Magrini G, Campana C, Rinaldi M, Pagani F, Vigano M and Tavazzi L (2001) Healing of acute Myocarditis with left ventricular assist device: morphological recovery and evolution to the a specific features of Dilated Cardiomyopathy. *Ital Heart J* 2:55-9.
8. Archard LC, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Olsen EG, Rose ML, Meany B, Why HJ and Richardson PJ (1991) Molecular probes for detection of persisting enterovirus infection of human heart and their prognostic value. *Eur Heart J* 12:56-9.
9. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JF, Olsen EGJ and Schoen F (1987) Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1:3-14.
10. Bauriedel G, Skowasch D und Lüderitz B (2005) Zertifizierte medizinische Fortbildung: Die chronische Herzinsuffizienz. *Dtsch Arztebl* 102:592-601

11. Bendler JR (1991) Idiopathic dilated cardiomyopathy. An immunologic, genetic or infectious disease, or all above? *Circulation* 83:704-706.
12. Bestetti RB (2004) Long-term follow-up of patients undergoing isolated partial left ventriculectomy. *Acta Cardiol* 59:405-8.
13. Billingham ME (1989) Acute myocarditis: is sampling error a contraindication for diagnostic biopsies? *J Am Coll Cardiol* 14:921-2.
14. Bowles NE, Ni J, Kearny DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Briker JT, Bowles KR and Towbin JA (2003) Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 42:466-472.
15. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG and Archard LC (1986) Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 17:1120-23.
16. Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, Carson P, DiCarlo L, DeMets D, White BG, DeVries DW and Feldman AM (2004) Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 350:2140-50.
17. Busse R: Gefäßsystem und Kreislaufregulation in Schmidt RF und Thews G (eds): *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1995) S.553.
18. Caforio AL, Baboonian C and McKenna WJ (1997) Postviral autoimmune heart disease--fact or fiction? *Eur Heart J* 18:1051-5.
19. Calabrese F, Rigo E, Milanesi O, Boffa GM, Angelini A, Valente M and Thieme G (2002) Molecular diagnosis of myocarditis and dilated cardiomyopathy in children: clinicopathologic features and prognostic implications. *Diagn Mol Pathol* 11:212-21.
20. Cambridge G, MacArthur CG, Waterson AP, Goodwin JF and Oakley CM (1979) Antibodies to Coxsackie B viruses in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 41:692-6.
21. Cazeau S, Alonso C, Jauvert G, Lazarus A and Ritter P (2004) Cardiac resynchronization therapy. *Europace* 5:42-8.
22. Chow LH, Ye Y, Linder J and McManus BM (1989) Phenotypic analysis of infiltrating cells in human myocarditis. An immunohistochemical study in paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 113:1357-62.
23. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 162:156-162.

24. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ and Melton LJ 3rd (1989) Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 80:564-72.
25. Criteria of the New York Heart Association (1967) Disease of the heart and blood vessels. Nomenclature and Criteria for diagnosis. 6th ed. Boston: Little, Brown, 1964:110.
26. Deguchi H, Fujioka S, Terasaki F, Ukimura A, Hirasawa M, Kintaka T, Kitaura Y, Kondo K, Sasaki S, Isomura T and Suma H (2001) Enterovirus RNA replication in cases of dilated cardiomyopathy: light microscopic in situ hybridization and virological analyses of myocardial specimens obtained at partial left ventriculectomy. *J Card Surg* 16:64-71.
27. Di Lenarda A, Pinamonti B, Mestroni L, Salvi A, Sabbadini G, Gregori D, Perkan A, Zecchin M, Carniel E, Bussani R, Silvestri F, Morgera T, Camerini F, Sinagra G and Gruppo di Studio sulle Malattie del Miocardio (2004) The natural history of dilated cardiomyopathy: a review of the Heart Muscle Disease Registry of Trieste *Ital Heart J* 5:253-66.
28. Dodge HT and Sheehan FH (1983) Quantitative contrast angiography for assessment of ventricular performance in heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1:73-81.
29. Erdmann E (2000) The management of heart failure-an overview. *Basic Res Cardiol* 95:13-7.
30. Farrell TG, Bashir Y, Cripps T, Malik M, Poloniecki J, Bennett D, Ward DE and Camm AJ (1991) Risk stratification for arrhythmic events in postinfarction patients based on heart rate variability, ambulatory electrocardiographic variables and the signal-averaged elektrokardiogramm. *JACC* 18:687-97.
31. Fei L, Keeling PJ, Gill JS, Bashir Y, Statters DJ, Poloniecki J, McKenna WJ and Camm AJ (1994) Heart rate variability and its relation to ventricular arrhythmias in congestive heart failure. *Brit Heart J* 71:322-28.
32. Figulla HR (2004) Transformation of myocarditis and inflammatory cardiomyopathy to idiopathic dilated cardiomyopathy: facts and fiction. *Med Microbiol Immunol* 193:61-4.
33. Figulla HR, Rahlf G, Nieger M, Luig H and Kreuzer H (1985) Spontaneous hemodynamic improvement or stabilization and associated biopsy findings in patients with congestive cardiomyopathy. *Circulation* 71:1095-104.
34. Figulla HR, Stille-Sieger M, Mall G, Heim A and Kreuzer H (1995) Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: A benign disease compared with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 25:1170-5.

35. Fowler MB (2004) Carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) trial: carvedilol in severe heart failure. *Am J Cardiol* 93:35B-9B.
36. Fujioka S, Kitaura Y, Deguchi H, Shimizu A, Isomura T, Suma H and Sabbah HN (2004) Evidence of viral infection in the myocardium of American and Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 94:602-5.
37. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, Deguchi H, Kawamura K, Isomura T, Suma H and Shimizu A (2000) Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 36:1920-6.
38. Grasso M, Arbustini E, Silini E, Diegoli M, Percivalle E, Ratti G, Bramerio M, Gavazzi A, Vigano M and Milanese G (1992) Search for Coxsackievirus B3 RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Am J Cardiol* 69:658-64.
39. Grimm W, Alter P and Maisch B (2004) Arrhythmia risk stratification with regard to prophylactic implantable defibrillator therapy in patients with dilated cardiomyopathy. Results of MACAS, DEFINITE and SCD-HeFT. *Herz* 29:348-52.
40. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, Vonhof S, Hein WJ, Müller G and Figulla HR (1999) Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myokarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol* 54:83-88.
41. Hahn EA, Hartz VL, Moon TE, O'Connell JB, Herskowitz A, McManus BM and Mason JW (1995) The Myocarditis Treatment Trial: design, methods and patients enrollment. *Eur Heart J* 16:162-7.
42. Heim A, Stille-Siegener M, Kandolf R, Kreuzer H and Figulla HR (1994) Enterovirus-induced myocarditis: hemodynamic deterioration with immunosuppressive therapy and successful application of interferon-alpha. *Clin Cardiol* 17:563-5.
43. Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell R and Munder T (2000) Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* 74:4284-90.
44. Herzum M, Weller R, Jomaa H, Wietzychowski F, Pankuweit S, Mahr P and Maisch B (1995) Left ventricular haemodynamics parameters in the cause of acute experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 27:1573-80.
45. Hjalmarson A and Fagerberg B (2000) MERIT-HF mortality and morbidity data. *Basic Res Cardiol* 95:198-103.

46. Hohenadl C, Klingel K, Mertsching J, Hofschneider PH and Kandolf R (1991) Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes* 5:11-20.
47. Hoppe UC and Erdmann E; Kommission Klinische Kardiologie (2001) [Guidelines for the treatment of chronic heart failure. Issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology--Heart and Circulation Research, compiled on behalf of the Commission of Clinical Cardiology in cooperation with Pharmaceutic Commission of the German Physicians' Association] *Z Kardiol* 90:218-37.
48. Horneftam B, Jerling M, Karlsson MO, Held P and DAAf Trial Group (2003) Intravenously administered digoxin in patients with acute atrial fibrillation: a population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis based on the Digitalis in Acute Atrial Fibrillation trial. *Eur J Clin Pharmacol* 58:747-55.
49. Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schönlau U and Maisch B (2000) The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 25:279-85.
50. Jin O, Sole MJ, Butany JW, Chia WK, McLaughlin PR, Liu P and Liew CC (1990). Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* 82:8-16.
51. Kandolf R and Hofschneider PH (1989) Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol* 11:1-13.
52. Kandolf R, Ameis D, Kirschner P, Canu A and Hofschneider PH (1987) In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridisation an. approach of the diagnosis of viral heart disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6272-76.
53. Kandolf R, Klingel K, Mertsching H, Canu A, Hohenadl C, Zell R, Reimann BY, Heim A, McManus BM and Foulis AK (1991) Molecular studies on enteroviral heart disease: patterns of acute and persistent infections. *Eur Heart J* 12:49-55.
54. Karcz M, Chojnowska L, Zareba W and Ruzyllo W (1993) Prognostic significance of heart rate variability in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 87:75-81.
55. Kawai C (1999) From myocarditis to cardiomyopathy: mechanism of inflammation and cell death. Learning from the past for the future. *Circulation* 99:1091-100.
56. Kleiger RE, Miller P, Bigger JT, Moss AJ and the Multicenter Post-Infarction Research Group (1987) Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 59:256-62.

57. Koide H, Kitaura Y, Deguchi H, Ukimura A, Kawamura K and Hirai K (1992) Genomic detection of enteroviruses in the myocardium--studies on animal hearts with coxsackievirus B3 myocarditis and endomyocardial biopsies from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 56:1081-93.
58. Kämmerer U, Kunkel B and Korn K (1994) Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses. *J Clin Microbiol* 32:285-91.
59. Kuhl U, Noutsias M and Schultheiss HP (1995) Immunhistochemie in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1995 16:100-6.
60. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B and Schultheiss HP (1996) Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 75:295-300.
61. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, Schannwell M, Welp LB and Schultheiss HP (1994) Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 1:13-25.
62. Kühl U, Pauschinger M und Schultheiss HP (1997) Ätiologenetische Differenzierung der entzündlichen Kardiomyopathie. *Internist* 38:590-601.
63. Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W and Schultheiss HP (2003) Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 107:2793-8.
64. Kyu B, Matsumori A, Sato Y, Okada I, Chapman NM and Tracy S (1992) Cardiac persistence of cardioviral RNA detected by polymerase chain reaction in a murine model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 86:522-30.
65. Leizorovicz A, Lechat P, Cucherat M and Bugnard F (2002) Bisoprolol for the treatment of chronic heart failure: a meta-analysis on individual data of two placebo-controlled studies—CIBIS and CIBIS II. Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study. *Am Heart J* 143:301-7.
66. Linde C, Braunschweig F, Gadler F, Bailleul C and Daubert JC (2003) Long-term improvements in quality of life by biventricular pacing in patients with chronic heart failure: results from the Multisite Stimulation in Cardiomyopathy study (MUSTIC). *Am J Cardiol* 91:1090-5.
67. Loellgen H (1999) Herzfrequenzvariabilität. *Dt Aerztebl* 96:A-2029-32.
68. Lotze U, Busch HJ, Aschoff A, Glück B, Sigusch H, Jirikowski G, Stelzner A and Figulla HR (2001) Damaged myocytes as detected by colocalization of DNA fragmentation and tissue transglutaminase and their prognostic significance in enterovirus-associated dilated cardiomyopathy. *Eur J of Clin Invest* 31:744-755.

69. Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Glück B, Dannberg G, Stelzner A and Figulla HR (2004) Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 193:75-82.
70. Mbaissouroum M, O'Sullivan C, Brecker SJ, Xiao HB and Gibson DG (1983) Shortened left ventricular filling time in dilated cardiomyopathy: additional effects on heart rate variability? *Brit Heart J* 69:327-331.
71. Maisch B (1998) Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC Task Force – mehr Fragen als Antworten? *Med. Klin* 93:199-209.
72. Maisch B (1998) Entzündliche Herzerkrankungen. Classen, Diel, Kochsiek (eds): *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, Germany, S.1198
73. Maisch B, Funcker R, Alter P, Portig I und Pankuweit S (2002) Dilatative Kardiomyopathie und Myokarditis. *Internist* 43:45-65.
74. Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G and Pankuweit S (2000) Definition of inflammatory Cardiomyopathy (Myokarditis): On the way to consensus. A status Report. *Herz* 25:200-9.
75. Maisch B, Ristic AD, Hufnagel G, Funck R, Alter P, Tontsch D and Pankuweit S (2002) Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz* 27:113-34.
76. Malik M (1996) Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93:1043-1065.
77. Mason JW (2002) Viral latency: A link between Myokarditis and Dilated Cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol* 34:695-689.
78. Mason JW (2003) Myokarditis and dilated cardiomyopathie: an inflammatory link. *Cardiovasc. Res* 60:5-10.
79. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME and Moon TE (1995) A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 333:269-75.
80. Mestroni L and Giacca M (1997) Molecular genetics of Dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 12:303-9.
81. Mestroni L, Rocco C, Vatta M, Miocic S and Giacca M (1998) Advances in molecular genetics of dilated cardiomyopathy. The heart muscle disease study group. *Cardiol Clin* 16:611-21.
82. Morita H (1981) Experimental coxsackie B-3 virus myocarditis in golden hamsters. Light and electron microscopy findings in a long-term follow-up study. *Jpn Circ J* 45:713-29.

83. Muir P, Nicholson F, Tilzey AJ, Signy M, English TA and Banatvala JE (1989) Chronic relapsing pericarditis and dilated cardiomyopathy: serological evidence of persistent enterovirus infection. *Lancet* 15:8047.
84. Narula J, Haider N, Virami R Di Salvo, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ; Dec W and Khaw BA (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *New Engl J Med* 335:1182-89.
85. Noutsias M, Pauschinger M, Kuhl U and Schultheiss HP (2002) Myocarditis and dilated cardiomyopathy. New methods in diagnosis and therapy. *MMW Fortschr Med* 144:36-40.
86. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP and Kuhl U (2003) Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 3:127-35.
87. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Chenkg W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loretto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC and Anversa P (1997) Apoptosis in failing human heart. *New Engl J Med* 336:1131:1141.
88. Pankuweit S, Portig I, Eckhardt H, Crombach M, Hufnagel G and Maisch B (2000) Prevalence of Viral Genome in Endomyocardial Biopsies from Patients with Inflammatory Heart Muscle Disease. *Herz* 3:221-226.
89. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Noutsia M, Kuhl U, Schwimmbeck LP and Schultheiss HP (2004) Viral heart disease: molekular diagnosis, clinical prognosis and treatment strategies. *Med Microbiol Immunol* 193:65-9.
90. Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R and Schultheiss HP (1999) Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 99:889-95.
91. Pauschinger M, Neil E, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP and Towbin JA (1999) Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 99:1348-54.
92. Petijean J, Kopecka H, Freymuth F, Langlard JM, Scanu P, Galateau F, Bouhour JB, Ferriere M, Charbonneau P and Komajada M (1992) Detection of enteroviruses in endomyokardial biopsy by molecular approach. *J Med Virol* 37:76-82.
93. Pitt B, Remme WJ, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleimann J and Gatlin M (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348:1309-21.
94. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J and Wittes J (1999) The effect of spironolacton on morbidity and mortality in

- patients with severe heart failure. Randomised Aldactone Evaluation Study Investigators *N Engl J Med* 341:709-17.
95. Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A and Skene A (2003) Carvedilol or Metoprolol European Trial Investigators. Comparison of Carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 362:7-13.
 96. Przibille O, Liebrich A, Nowak B, Rosocha S, Zellerhoff Ch, Geil S, Himmrich E, Treese N und Meyer J (1998) Die prognostische Bedeutung der Herzfrequenzvariabilitätsanalyse bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. *Z Kardiol* 87:453-458.
 97. Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF) (1999) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL *Lancet* 353:2001-7.
 98. Reiffel JA (2000) Drug choices in the treatment of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 85:12D-19D.
 99. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies (1980) *Br Heart J* 44:672-3.
 100. Rich MW, Saini JS, Kleiger RE, Carney RM, Te Velde A and Freedland KE (1988) Correlation of heart rate variability with clinical and angiographic variables and late mortality after coronary angiography. *Am J Cardiol* 62:714-17.
 101. Richardson P, McKenna W and Bristow M (1996) For the WHO/ISFC task force. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology, Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 93:844-2.
 102. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, De Maria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, Silverman NH and Tajik AJ (1989) Recommendations for quantification of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Echocardiogr* 2:358-367.
 103. Schoenberger J, Zimmer M und Ertl G (2004) Genetik der dilatativen Kardiomyopathie. *Dtsch Arztebl* 101:1099-1105.
 104. Schoppet M and Maisch B (2001). Alcohol and the heart. *Herz* 26:345-52.
 105. Schwarz EM, Badorff C, Hiura TS, Wessely R, Badorff A, Verma IM and Knowlton KU (1998) NF-kappaB-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyokarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice. *J Virol* 72:5654-60.

106. Sigusch H, Reinhardt D und Kühnle F (2004) Idiopathische und enterovirusassoziierte dilatative Kardiomyopathie. *Dtsch Arztebl* 15:342-345.
107. Stein PK, Domitrovich PP, Kleiger RE, Schechtman KB and Rottman JN (2000) Clinical and demographic determinants of heart rate variability in patients post myocardial infarction: insights from the cardiac arrhythmia suppression trial (CAST). *Clin Cardiol* 23:187-94.
108. Stein PK, Domitrovich PP, Kleiger RE, Schechtman KB and Rottman JN (2000) Clinical and demographic determinants of heart rate variability in patients post myocardial infarction: insights from the cardiac arrhythmia suppression trial (CAST). *Clin Cardiol* 23:187-94.
109. Strauer BE (1995) Consensus conference. Myocarditis-dilated cardiomyopathy. Inaugurated by the German Society of Internal Medicine. *Internist* 36:484-502.
110. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology: Remme WJ and Swedberg K (Co-Chairmen) (2001) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 22:1527-60.
111. Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, Robinson ML, Robertson AD, Carniel D, Di Lenarda A, Bohlmeier TJ, Ferguson DA, Brodsky GL, Boucek MM, Lascor J, Moos AC, Li WL, Stetler GL, Muntoni F, Bristow MR, Mestroni L and Familial Dilated Cardiomyopathy Registry Research Group (2003) Natural history of dilated cardiomyopathy due to laminin A/C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 41:771-80.
112. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. (1999) *Lancet* 353:9-13.
113. Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT and Agol VI (1995) Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol* 69:1181-9.
114. Tracy S, Chapman NM, McManus BM, Pallansch MA, Beck MA and Carstens J (1990) A molecular and serologic evaluation of enteroviral involvement in human myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 22:403-14.
115. Vester EG, Klein RM, Kuhl U, Schultheiss HP, Perings C, Hennesdorf M, Ganschow US, Schannwell CM and Strauer BE (1997) Immunosuppressive therapy for effective suppression of life threatening ventricular tachyarrhythmias in chronic myocarditis. *Kardiol* 86:298-308.
116. Weiss LM, Liu XF, Chang KL and Billingham ME (1992) Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissue. *J Clin invest* 90:156-159.

117. Weiss LM, Movahed LA, Billingham ME and Cleary ML (1991) Detection of Coxsackievirus B3 RNA in myocardial tissues by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 138:497-503.
118. Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R and Knowlton KU (1998) Low level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture. An approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation* 98:450-7.
119. WHO/ISFC Task Force: Richardson P, McKenna W and Bristow M (1995) Report of the World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies.
120. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC (1994) Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 89:2582-2589.
121. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM and Wodniecki J (2001) Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation*. 2001 104:39-45.
122. Yi G, Goldmann JH, Keeling PJ, Reardon M, McKenna WJ and Malik M (1997) Heart rate variability in dilated cardiomyopathy: relation to disease severity and prognosis. *Heart* 77:108-14.
123. Young JB, Dunlap ME, Pfeffer MA, Probstfield JL, Cohen-Solal A, Dietz R, Granger CB, Hradec J, Kuch J, McKelvie RS, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Held P, Solomon SD, Yusuf S and Swedberg K; Candesartan in Heart failure Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) Investigators and Committees (2004) Mortality and morbidity reduction with Candesartan in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction: results of the CHARM low-left ventricular ejection fraction trials. *Circulation*. 110:2618-26.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. U. Lotze, Chefarzt Innere Medizin I, Krankenhaus Waltershausen-Friedrichroda GmbH, ehemaliger Oberarzt der Klinik für Innere Medizin I, FSU Jena, für seine förderlichen Hinweise, seine freundliche und unkomplizierte Unterstützung, sowie für die Einführung in die medizinische Statistik.

Gleichzeitig gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Mall für die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen, Frau Dr. Glück für die mikrobiologischen Nachweise der Enteroviren sowie Herrn PD Dr. Sigusch und Dr. Reinhardt für die immunhistologischen Untersuchungen, sowie allen Patienten, welche der Auswertung ihrer Befunde zugestimmt haben, um diese Arbeit zu ermöglichen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Nadine Fröbe für ihre sagenhafte Geduld und Motivationsfähigkeit bedanken, mit der sie mir stets zur Seite stand.

Mein inniger Dank gilt meinem Lebensgefährten Toralf Sperschneider, ohne den ich den Doktorhut nicht erhalten hätte.

Christiane Tresselt

Lebenslauf

Tresselt, Christiane

08. 06. 1975	geboren in Jena/Thüringen
1982 – 1990	POS Fichte-Schule Jena (Grundschule)
1990 – 1994	IGS Grete-Unrein-Schule Jena (Gymnasium)
26. 06. 1994	Erwerb der Hochschulreife (Abitur)
1994 – 1995	Anglistikstudium an der Brasshouse-Language-School Birmingham/England
1995 – 2002	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10. 06. 2002	Staatsexamen an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2002– 2004	Ärztin im Praktikum, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonsspital Schaffhausen, Schweiz
2004 – 2005	Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonsspital Schaffhausen, Schweiz
ab 01/2006	Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsspital Basel, Schweiz

Basel, den 12. 03. 2006

Christiane Tresselt

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. U. Lotze,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht haben und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Schaffhausen, den 07. 04. 2005

Christiane Tresselt